

UNIVERSITÉ PARIS VII

ENSEMBLE DE TRAVAUX PRÉSENTÉS POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT ÈS-SCIENCES PAR

M^{me} Jacqueline LONDON

ÉTUDES SUR LA BIOSYNTHÈSE,
L'EXPRESSION ET LA STRUCTURE
DE LA TRYPTOPHANASE D'ESCHERICHIA COLI K12

Soutenue le 2 juillet 1974 devant la Commission d'examen

M. MONOD	<i>Président</i>
Mlle YON	<i>Rapporteur</i>
M. AUBERT	} <i>Examineurs</i>
M. GOLDBERG	

PARIS 1974

UNIVERSITÉ PARIS 70

ÉTUDES SUR LA BIOSYNTHÈSE,
L'EXPRESSION ET LA STRUCTURE
DE LA TRYPTOPHANASE D'ESCHERICHIA COLI K12

M. MONTAUDO

M. VAN

M. AUBERT

M. COLLETTA

PARIS 3512

UNIVERSITÉ PARIS VII

ENSEMBLE DE TRAVAUX PRÉSENTÉS POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT ÈS-SCIENCES PAR

M^{me} Jacqueline LONDON

ÉTUDES SUR LA BIOSYNTHÈSE, L'EXPRESSION ET LA STRUCTURE DE LA TRYPTOPHANASE D'ESCHERICHIA COLI K12

Soutenue le 2 juillet 1974 devant la Commission d'examen

M. MONOD	<i>Président</i>
Mlle YON	<i>Rapporteur</i>
M. AUBERT	} <i>Examineurs</i>
M. GOLDBERG	

PARIS 1974

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

RECEIVED FROM THE UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

100 UNIVERSITY AVENUE TORONTO

STUDIES ON THE BIOCHEMISTRY
OF THE TRYPTOPHAN METABOLISM
- LYSINE AND THE TRYPTOPHAN -
BY DR. J. H. M. VAN DER KAM



RECEIVED FROM THE UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY
100 UNIVERSITY AVENUE
TORONTO, CANADA
M5S 1A5

1971 1972

En souvenir de ma mère.

POUR SALOMÉ.

*Que chacun, scientifique ou non,
qui a pris place sur le chemin
menant de l'idée à la réalisation de cette thèse
trouve ici tous mes remerciements.*

J'adresse mes sincères remerciements à :

- *Monsieur Jacques Monod,
qui m'a accordé sa confiance pour ce travail initié par
lui et qui a accepté avec une extrême gentillesse de
présider cette soutenance.*
- *Monsieur Michel Goldberg,
qui m'a accordé son accueil chaleureux et prodigué des
conseils précieux sans lesquels cette thèse n'aurait pu
voir le jour.*
- *Mademoiselle Janine Yon,
dont je fus l'étudiante
et que je remercie vivement d'avoir accepté de prêter
son attention à ce travail et d'en être le rapporteur.*
- *Monsieur Jean-Paul Aubert,
qui, parrain de ce travail,
a su me donner le courage de l'amener à son terme.*
- *Monsieur Jean Coursaget,
qui m'a prodigué les moyens et les encouragements dont
j'ai bénéficié lors de mes débuts dans la recherche.*
- *Tous mes collègues de l'U.E.R. de Biochimie,
et particulièrement Messieurs A. Delfour et D. Blangy,
qui ont su faire que l'enseignement ne soit pas rupture
par rapport à la recherche.*

ARTICLES JOINTS

1. « Purification de la Tryptophanase d'*Escherichia coli* par la centrifugation zonale »

J. LONDON, M.E. GOLDBERG

European Symposium of Zonal Centrifugation in Density Gradient.

Edit. : Cité Nouvelle, Paris, 1974, p. 122.

2. « The Tryptophanase from *Escherichia coli* K12.

I. — Purification, physical properties and quaternary structure »

J. LONDON, M.E. GOLDBERG

J. Biol. Chem., 247, 1566 (1972).

3. « Renaturation of *E. coli* Tryptophanase after exposure to 8 M urea »

J. LONDON, C. SKRZY尼亚, M.E. GOLDBERG

Eur. J. Biochem, 47, 409 (1974).

4. « The Tryptophanase from *Escherichia coli* K12.

III. — Further characterization of hybrids between the apo and holoenzyme »

C. SKRZY尼亚, J. LONDON,, M.E. GOLDBERG

J. Biol. Chem., 249, 2325 (1974).

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	17
MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
CHAPITRE I. — <i>Purification de la Tryptophanase</i> .	33
CHAPITRE II. — <i>Propriétés physiques et structure quaternaire</i>	47
CHAPITRE III. — <i>Propriétés de dénaturation réversible de la Tryptophanase</i>	65
CHAPITRE IV. — <i>Couplage entre structure tertiaire et structure quaternaire de la Tryptophanase</i>	89
CHAPITRE V. — <i>Propriétés de la biosynthèse de la Tryptophanase en milieu riche</i> ..	99
CONCLUSION GÉNÉRALE	141

INTRODUCTION

De nombreuses protéines existant actuellement dans les organismes sont des oligomères.

L'étude de quelques enzymes régulateurs intervenant à des points stratégiques du métabolisme cellulaire a montré qu'ils sont toujours constitués de plusieurs sous-unités et que leur activité catalytique est le plus souvent régulée par la présence de ligands autres que le substrat.

Si les théories de l'allostérie (Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P., 1965) et du modèle séquentiel de Koshland (Haber, J.E., Koshland, D.E. Jr., 1967) ont permis de comprendre l'avantage sélectif des protéines oligomériques à fonction régulatrice, il est difficile d'expliquer pourquoi la cellule, même pour des protéines non régulatrices, synthétise plusieurs chaînes identiques s'associant dans une protéine.

L'avantage sélectif conféré par une structure oligomérique doit sans doute provenir d'un avantage fonctionnel.

Or les propriétés fonctionnelles d'une macromolécule biologique sont la résultante de deux types de processus distincts : d'une part, la capacité de cette macromolécule à acquérir spontanément sa structure stéréospécifique et d'autre part, une fois cette structure acquise, sa capacité à interagir avec les ligands spécifiques.

On peut alors se demander si les propriétés fonctionnelles ainsi définies d'un protomère sont semblables lorsque celui-ci est isolé ou en interaction avec d'autres protomères d'une même protéine.

Les quelques expériences faites in vitro pour répondre à cette question montrent que la réponse n'est pas univoque : le monomère de la D-amino acide oxydase est actif, qu'il soit isolé ou au sein du tétramère, tandis que les dimères de Lactate déshydrogénase de muscle de lapin et de Thréonine désaminase d'E. coli sont inactifs à moins d'être associés en tétramère. L'interprétation de ces résultats est toutefois com-

pliée par le fait que le protomère d'un oligomère est souvent obtenu dans des conditions trop dénaturantes pour que la mesure des propriétés fonctionnelles soit possible.

Néanmoins, lorsque l'étude a été faite, elle a montré que des propriétés du monomère isolé ou en interaction au sein d'un oligomère sont différentes et c'est pour rendre compte de cette différence que des études sur les interactions entre les sous-unités ont été abordées.

La structure tridimensionnelle d'une protéine oligomérique, et en particulier les interactions quaternaires entre sous-unités, sont déterminées dans des conditions d'environnement données par la structure primaire.

Jusque récemment il était admis que seuls les processus obéissant aux lois de la thermodynamique contrôlaient le repliement des macromolécules biologiques pour établir la structure dite native qui est l'une des structures possibles d'énergie libre minimum (Eyring, H., 1931) ; or le temps requis in vivo pour qu'une protéine acquière sa structure tridimensionnelle est incompatible avec un processus contrôlé uniquement thermodynamiquement (Levinthal, C., 1968).

D'où, l'hypothèse que des processus cinétiquement orientés sont impliqués dans l'acquisition de la structure tridimensionnelle des protéines (Wetlaufer, D.E., 1973).

Les études cinétiques récentes de dénaturation réversible de protéines semblent apporter des preuves du rôle des paramètres cinétiques dans le repliement ou « folding » in vitro des macromolécules biologiques (Anfinsen, C.B., 1972 ; Tsong, T.Y. et al., 1972). Il semble en être de même pour le repliement in vivo lors de la biosynthèse sur les ribosomes des différentes chaînes polypeptidiques constituant un oligomère, comme le montrent les travaux sur les immunoglobulines IgG de myelomes de souris (Shapiro, A.L. et al., 1966) et sur l'hémoglobine de lapin (Colombo, B., 1966).

Si le repliement de la chaîne polypeptidique d'un protomère est cinétiquement orienté, on peut se demander si in vivo c'est ce repliement qui commande des interactions entre protomères telles qu'ils s'associent pour former la protéine oligomérique, ou si la structure quaternaire, elle aussi, joue un rôle déterminant dans le « folding » de chaque protomère.

Dans cette deuxième hypothèse, la structure quater-

naire, induite par le repliement des chaînes polypeptidiques des protomères, modifierait en retour ce repliement et l'ensemble des protomères en association atteindrait un état d'équilibre qui conférerait à l'oligomère la capacité de ses propriétés fonctionnelles.

L'existence d'un tel couplage à double sens entre structure tertiaire et structure quaternaire d'un oligomère serait l'expression d'une part de la détermination de la structure quaternaire par la structure tertiaire et d'autre part du rôle de la structure quaternaire à moduler le repliement initial des protomères.

C'est la question de l'existence de ce couplage et de sa mise en évidence qui est à l'origine du travail de cette thèse.

L'étude d'enzymes allostériques présentait déjà des renseignements sur les interactions quaternaires mais les paramètres qui les mettaient en évidence étaient souvent des paramètres de l'activité catalytique. Or, si nous voulions étudier le couplage entre structure tertiaire et quaternaire, il était souhaitable d'utiliser un oligomère dont les interactions quaternaires pouvaient facilement être mises en évidence par les modifications d'un paramètre structural. A cet égard la Tryptophanase d'E. coli B étudiée par Morino et Snell (1967) semblait un enzyme tout à fait approprié.

En effet, cet enzyme tétramérique semblait constitué de huit chaînes polypeptidiques chimiquement identiques ayant seulement quatre sites de fixation pour son coenzyme (le Pyridoxal Phosphate). L'existence de chaînes polypeptidiques chimiquement identiques et fonctionnellement différentes posait le problème de l'origine de leur différenciation et de leur mode de structuration.

De plus, le coenzyme indispensable à l'activité catalytique semblait avoir un rôle sur la structure quaternaire : alors qu'il se fixait stoechiométriquement sur l'enzyme et que les propriétés cinétiques de l'activité enzymatique étaient michaéliennes, il modifiait de manière coopérative l'un des paramètres de sa structure quaternaire.

Les deux éléments que nous venons d'exposer très brièvement nous ont conduit à choisir la Tryptophanase pour étudier les relations entre les structures tertiaire et quaternaire d'une protéine oligomérique sans fonction régulatrice.

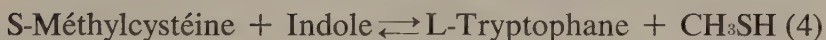
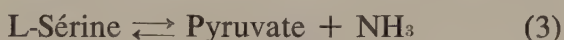
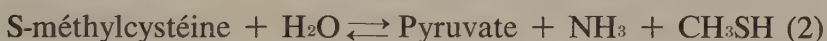
RAPPEL DES PROPRIETES DE LA TRYPTOPHANASE

D'ESCHERICHIA COLI B

La Tryptophanase est un enzyme qui catalyse principalement la dégradation du Tryptophane.



Cet enzyme catalyse, en outre, des réactions d' α β éliminations (2 et 3) et de β remplacements (4 et 5)



La présence de Pyridoxal Phosphate comme coenzyme est nécessaire pour toutes ces réactions enzymatiques.

A l'époque où nous avons commencé le travail sur la Tryptophanase, l'étude physico-chimique de Morino et Snell (1967) semblait indiquer que la protéine, de poids moléculaire 220 000 D était constituée de 4 monomères formés chacun de deux chaînes polypeptidiques identiques dont une seule portait un site de fixation pour le Pyridoxal-phosphate. Chaque monomère semblait donc constitué de deux chaînes polypeptidiques chimiquement identiques mais structurellement et par suite fonctionnellement différentes.

Les propriétés hydrodynamiques de l'enzyme associé ou non à son coenzyme (Holoenzyme et Apoenzyme) étaient notablement différentes comme le montre le tableau ci-dessous.

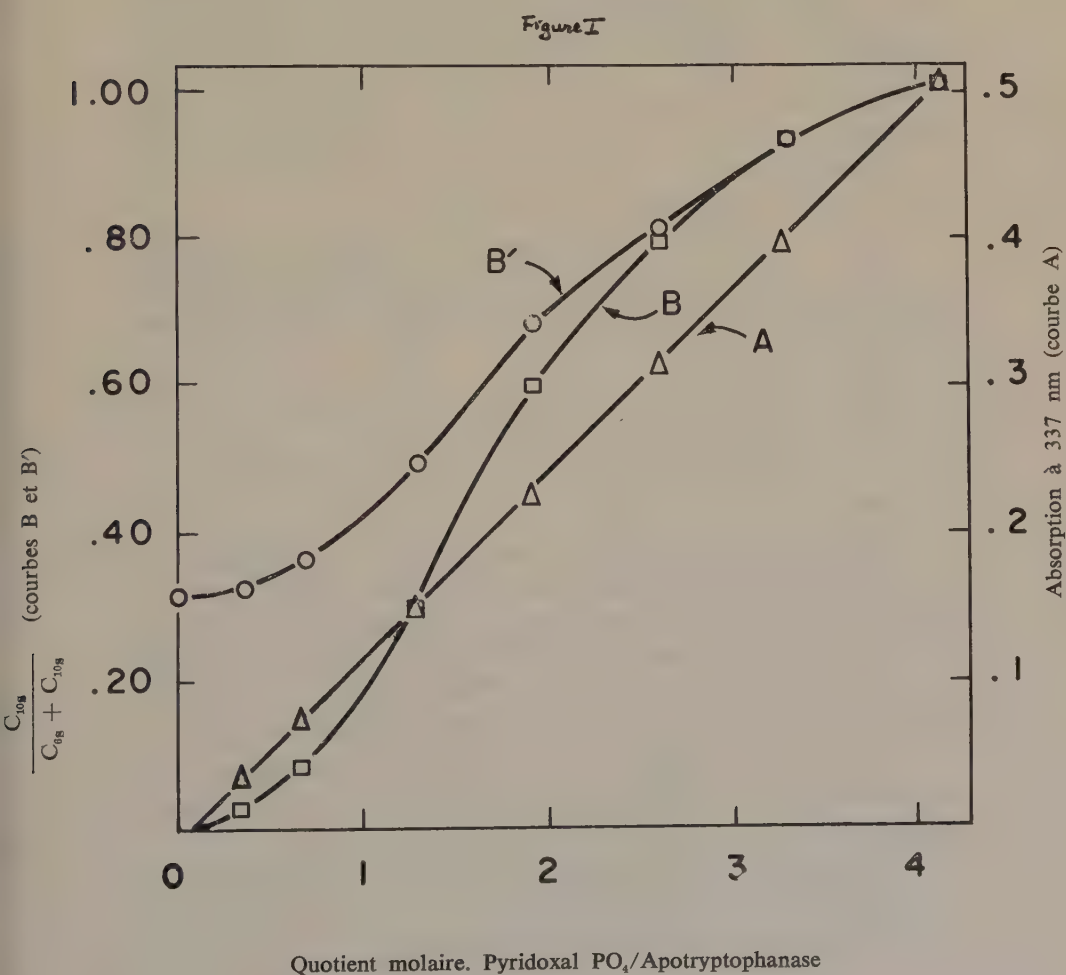
TABLEAU
DES CARACTERISTIQUES HYDRODYNAMIQUES
DE LA TRYPTOPHANASE D'E. COLI B
DETERMINEES PAR SNELL ET COLL.

Conditions de centrifugation	Apoenzyme	Holoenzyme
$\Theta = 25^{\circ} \text{ C}$ $\text{pH} = 8.0$ en présence d'ions potassium	• Sédimentation $S_{20,w} = 9,5 \text{ S}$ • Viscosité Intrinsèque $\frac{N_{sp}}{c} = 5,55 \text{ ml/g}$ • Masse Moléculaire $M = 220\,000 \text{ D.}$	• Sédimentation $S_{20,w} = 10,5 \text{ S}$ • Viscosité Intrinsèque $\frac{N_{sp}}{c} = 9,8 \text{ ml/g}$ • Masse Moléculaire $220\,000 \text{ D.}$
$\Theta = 25^{\circ} \text{ C}$ $\text{pH} = 8.0$ en présence d'imidazole	• Sédimentation $S_{20,w} = 9,5 \text{ S}$	• Sédimentation $S_{20,w} = 9,5 \text{ S}$
$\Theta = 4^{\circ} \text{ C}$ $\text{pH} = 8.0$ en présence d'ions potassium	• Sédimentation $S_{20,w} = 6,0 \text{ S}$	• Sédimentation $S_{20,w} = 10,5 \text{ S}$
$\Theta = 25^{\circ} \text{ C}$ $\text{pH} > 10$ en présence de sodium dodécylsulfate	• Sédimentation $S_{20,w} = 3,0-3,5 \text{ S}$	• Sédimentation $S_{20,w} = 3,0-3,5 \text{ S}$

La grande variation du coefficient de sédimentation entre l'apo- et l'holoenzyme à 25° C montre que l'apoenzyme tétramérique subit un changement de conformation important lorsqu'il fixe le PLP ; d'autres enzymes à coenzyme ont la même propriété, mais l'ampleur du changement de conformation est rarement aussi grande (O'Leary, H.M., 1972 ; Bertland, 1968).

A 4° C , l'holotétramère est stable tandis que l'apotétramère se dissocie en apodimères. Cette dissociation est réversible par élévation de température ou par addition de

Pyridoxal-phosphate. Fait remarquable, alors que la fixation du coenzyme est stoechiométrique, la réassociation des Apodimères en tétramère par addition de PLP, est un phénomène coopératif, comme le montre la courbe B de la figure 1. Le pourcentage de forme tétramérique par rapport à la forme dimérique ne varie pas linéairement en fonction de la quantité de pyridoxal phosphate ajouté. L'addition du coenzyme modifie la structure dimérique de sorte que ce n'est qu'à partir d'une certaine saturation par le PLP que du tétramère apparaît ; dès lors, le pourcentage des deux formes varie fortement avec la concentration de PLP.



Il y avait donc dans ce phénomène coopératif la preuve de l'existence d'une liaison étroite entre structure tertiaire et quaternaire de l'enzyme : on pouvait alors se demander si la réciproque était vraie ; à savoir la modification d'interactions quaternaires au sein d'un oligomère produirait-elle un changement au niveau de la structure tertiaire des protomères ? C'est dans ce cadre que le travail sur la Tryptophanase a débuté.

Alors que les travaux de Morino et Snell (1967) avaient été effectués sur la Tryptophanase d'*E. coli* B, nous avons décidé d'étudier l'enzyme d'*E. coli* K12.

Nous pensions, en effet, pouvoir être amenés à isoler des mutants de cet enzyme et il nous semblait plus logique de travailler sur l'organisme dont la génétique est la mieux connue.

Les Tryptophanases d'*E. coli* B et K12 devaient être identiques puisque tous les enzymes étudiés chez ces deux organismes, à très peu d'exception près, présentaient des propriétés physico-chimiques identiques.

Notre travail a d'abord consisté à choisir une souche bactérienne d'*E. coli* K12 et à déterminer les conditions physiologiques d'obtention d'un extrait brut à haute activité spécifique *Tryptophanase*.

Notre choix s'est finalement porté sur la souche Hfr 3000 d'*Escherichia coli* K12.

Le premier chapitre concerne la purification de l'enzyme.

Après avoir très brièvement donné les conditions de culture permettant d'obtenir un extrait brut dont l'activité Tryptophanase soit élevée, nous exposerons la technique de purification de l'enzyme, publiée dans l'article ci-joint, et nous donnerons quelques améliorations techniques apportées depuis la parution de cet article.

Le deuxième chapitre est l'Etude des différentes propriétés de la structure quaternaire de la Tryptophanase d'*E. coli* K12.

Celles-ci sont comparées à celles de la Tryptophanase d'*E. coli* B.

Le troisième chapitre porte sur l'Etude des propriétés

de dénaturation-renaturation par l'urée 8 M de la Tryptophanase.

Nous discuterons ces propriétés en fonction des problèmes que pose l'acquisition de la structure tridimensionnelle d'une protéine oligomérique.

Le quatrième chapitre est consacré au problème spécifique du Couplage énergétique entre structure tertiaire et quaternaire de la Tryptophanase.

Le cinquième chapitre présente un ensemble d'expériences sur la Biosynthèse de l'enzyme.

Nous avons entrepris ce travail car l'une des propriétés de la biosynthèse de cet enzyme posait le problème du repliement *in vivo* de cet enzyme oligomérique et faisait suite logiquement aux propriétés physicochimiques *in vitro* que nous avons mises en évidence.

MATERIEL ET METHODES

1) Souches bactériennes et milieux de culture

L'enzyme est extrait de la souche Hfr 3000 d'*Escherichia coli* K12, auxotrophe pour la vitamine B₁.

Nous avons aussi utilisé la souche B₁T₇A d'E. coli B étudiée par Snell.

Plusieurs types de milieu liquide ont été utilisés :

— Milieu minimal synthétique n° 63

contenant :

— KH ₂ PO ₄	13,6	g
— MgSO ₄ + 7 H ₂ O	0,2	g
— SO ₄ (NH ₄) ₂	0,005	g
— H ₂ O distillée q s p	1	litre

ajusté à pH = 7,2 avec KOH.

La vitamine B₁ a été ajoutée à une concentration de 0,0002 %.

La source de carbone est à une concentration de 0,4 %.

— Milieu riche Lennox (ML)

contenant :

— Extrait de levure	5	g
— Bactotryptone	10	g
— NaCl	5	g
— H ₂ O q s p	1	litre

ajusté à pH = 7,4 avec KOH.

— Milieu riche : Casamino acides (C.A.)

A un milieu 63 B₁ + glycérol 0,4 %, on ajoute des Casamino acides à concentration variant de 0,05 % à 2 %.

Les cultures sont faites en aérobie à 37° C, en fioles

Fernbach pour la purification, et en tubes à essais ou erlenmeyers pour l'étude de la biosynthèse de la Tryptophanase. Un inoculum de 0,2 % est ajouté au milieu de culture.

2) Produits utilisés

— Acide anthranilique	Sigma
— Acide sulfurique (H_2SO_4) R.P. ..	Prolabo
— Butanol primaire R.P.	Prolabo
— p-Diméthylamino benzaldehyde ...	Merck
— Dithiothreitol	Merck
— Glutathion réduit	Sigma
— Indole	Prolabo
— DL-cynurenine	Sigma
— Lactico déshydrogénase	Sigma
— β -Mercaptoethanol (βSH)	Merck
— S-Méthylcystéine	Fluka
— β -Nicotinamide adenine dinucleotide ($\beta DPNH$)	Sigma
— Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	Merck
— Phosphate dipotassique (K_2HPO_4) .	Merck
— Pyridoxal phosphate (PLP)	Sigma
— Saccharose	Merck
— L-sérine	Calbiochem
— Sérum albumine de bœuf (BSA) ..	Sigma
— Sodium dodécyl sulfate (SDS)	Merck
— Sulfate de potassium	Merck
— Sulfate de protamine	Sigma
— Toluène R.P.	Prolabo
— Tryptamine	Fluka
— Tryptophane :	
— comme substrat	Calbiochem
— comme inducteur	Prolabo
— Tryptophane radioactif	Commissariat à l'Energie atomique (Saclay)

3) Extraction de l'activité enzymatique

Les mesures d'activité enzymatique ont été effectuées soit sur des extraits bruts, soit sur des suspensions bactériennes.

— *Extraits bruts*

L'échantillon bactérien, lavé, est resuspendu dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH = 7,8, additionné de Pyridoxal phosphate à 10^{-4} M.

Il est désintégré aux ultrasons soit avec un appareil Mullard pendant 4 fois 15 secondes pour des cultures de 5 ml, soit avec un appareil Brönson pendant 5 fois 3 minutes pour des cultures plus importantes en volume.

Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation dans une centrifugeuse « Sorvall » SS4 à 15 000 rpm pendant 30 minutes à 4° C ou dans une centrifugeuse « Internationale » pendant 2 à 5 minutes, pour des cultures de petit volume.

La concentration protéique est mesurée par la méthode de Folin (Lowry, 1951) et Biuret (Gornall, 1949).

— *Suspensions bactériennes*

Les cultures lavées et resuspendues dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH = 7,8 additionné de Pyridoxal phosphate à 10^{-4} M sont traitées au Deoxycholate et au Toluène, sous agitation vigoureuse à 37° C pendant 20 à 30 minutes.

La concentration protéique est déterminée avant traitement par la mesure de la densité optique à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss.

Nous avons déterminé que $1 \text{ D.O.}_{600 \text{ nm}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ de protéines par comparaison avec des mesures de concentrations protéiques sur des extraits bruts.

4) Mesure des activités enzymatiques

A. - *Activité Tryptophanase*

Elle consiste à mesurer l'indole formé à partir de Tryptophane par catalyse enzymatique.

Le milieu de dosage est constitué de :

- Tampon KPO_4 0,1 M, pH = 7,8
- Sérum albumine de bœuf : 250 $\mu\text{g/ml}$
- Glutathion réduit : 10^{-4} M
- Pyridoxal phosphate : 10^{-4} M

Dans des erlenmeyers de 50 ml, contenant 0,3 ml du tampon de dosage, on ajoute 100 μ l de solution enzymatique et 2 ml de Toluène ; on incube à 37° C.

On démarre la réaction enzymatique par addition de 100 μ l de Tryptophane à 10 mg/ml.

La réaction se poursuit sous agitation vigoureuse à 37° C, dans un bain « Brunswick ». L'indole inhibiteur formé au cours de la réaction enzymatique est ainsi piégé dans la phase Toluène, et est révélé, après la durée de dosage désirée, par 3,5 ml de réactif d'Erlich fraîchement préparé (5 volumes de 5 % p. diméthylamino-benzaldehyde dans de l'éthanol à 95 %, additionné de 12 volumes d'acide sulfurique 5 % dans le n-butanol). L'Indole libéré donne avec ce réactif une coloration stable 25 mn après son addition qui est lue à 570 nm.

L'activité est exprimée en unités/ml d'enzyme (μ Moles d'Indole libérées par minute et par ml d'enzyme).

B. - *Activité Sérine désaminase*

Elle consiste à mesurer le pyruvate formé à partir de Sérine, par catalyse enzymatique.

Le milieu de dosage contient :

- Sérum albumine de bœuf : 250 μ g/ml
- Pyridoxal phosphate : 10^{-4} M
- Glutathion réduit : 10^{-4} M

A 0,4 ml de ce tampon, on ajoute 100 μ l d'enzyme. On incube à 37° C pendant 5 mn et on démarre la réaction par addition de 100 μ l de sérine à 10^{-2} M.

On arrête la réaction enzymatique par addition de 100 μ l de NaOH 2,5 N. On ajoute ensuite 0,5 ml de 2,4-dinitrophényl-hydrazine dans HCl 2 N et, 5 mn après, 1,5 ml d'alcool absolu.

La coloration est enfin révélée par addition de 2,5 ml de NaOH 2,5 N ; après 10 mn, celle-ci est lue à 250 nm.

C. - *Activité S-Méthylcystéine*

Elle consiste, grâce à une déshydrogénase couplée à la Tryptophanase, à mesurer le pyruvate formé à partir de S-Méthylcystéine.

Le milieu de dosage contient :

- Tampon KPO_4 0,1 M, pH = 7,8 : 10 ml
- S-Méthylcystéine : 45 mg
- B S A : 1,25 mg
- P L P : 10^{-4} M finale
- Glutathion réduit : 2×10^{-4} M finale
- Lactico déshydrogénase : 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ finale
- D P N H : $2,5 \times 10^{-4}$ M finale.

Après avoir incubé 1 ml du milieu de dosage à 37° C pendant 5 mn, on ajoute 2 à 5 μg d'enzyme. La réaction se poursuit à 37° C, pendant 5 à 15 mn et est arrêtée par addition d'indode $1,5 \times 10^{-3}$ M finale.

Le pyruvate libéré est mesuré par la disparition du DPNH à 340 nm.

5) Techniques de centrifugation

A. - Centrifugation zonale

C'est l'une des étapes de la purification de l'enzyme.

Elle est effectuée dans une centrifugeuse MSE Super Speed 65, munie d'un rotor B XIV en titane. Le gradient linéaire de sucrose entre 5-20 % et 10-30 % est réalisé avec une pompe à gradient de haute capacité, fabriquée par Beckman.

B. - Centrifugations en gradients de sucrose

Des gradients de sucrose de 5 à 20 % sont préparés dans des tubes de 5 ml et additionnés de 150 μl de l'échantillon désiré.

Les centrifugations sont faites à 4° C dans deux types de centrifugeuses.

- Spinco L₂ 65_B
- MSE Super Speed 65 - Mark II

Le rotor utilisé est un Swing out rotor de 3×5 ml.

Les fractions de 8 à 16 gouttes ont été collectées à l'aide d'un tube perceur MSE.

C. - Centrifugation analytique

Elle est effectuée dans une ultracentrifugeuse analytique Spinco, de modèle E, accompagnée soit d'un système optique Schlieren, soit d'un système optique d'absorption de type Scanner.

6) Techniques de dialyse

Que ce soit au cours de la purification ou lors des expériences de dénaturation-renaturation, les dialyses ont toujours été effectuées en plaçant la solution enzymatique dans des sacs à dialyse préalablement traités à l'alcool et au carbonate de sodium, et en dialysant contre un volume de tampon 500 fois à 1 000 fois plus grand que l'échantillon.

CHAPITRE I

PURIFICATION DE LA TRYPTOPHANASE

Une culture de la souche Hfr 3000 d'*E. coli* K12 effectuée en 12 fioles Fernbach contenant chacune 250 ml de Milieu Riche (ML), additionné de Tryptophane à 2 mg/ml estensemencée avec 10 ml de bactéries ayant atteint la phase stationnaire de croissance en Milieu Minimum (63 gly B₁). Après huit heures sous agitation à 37° C, on obtient 30 grammes de bactéries contenant de la Tryptophanase dont l'activité spécifique dans l'extrait brut est de 2,5 unités/mg.

Ces conditions de culture peuvent, certes, paraître mystérieuses au lecteur ; mais si celui-ci sait attendre le dernier chapitre de ce travail, il pourra y trouver quelques explications.

A partir de l'extrait brut de ces bactéries on purifie l'enzyme selon la méthode décrite dans l'article ci-joint, dont la centrifugation zonale en gradient linéaire de sucrose constitue la principale nouveauté par rapport à la purification décrite par Newton et Snell (1964).

Les différentes étapes sont décrites dans cet article ainsi que la comparaison des résultats de cette purification et de ceux donnés par Newton et Snell (1964). On obtient, à partir de 30 g de bactéries humides, 70 mg de Tryptophanase dont l'activité spécifique est de 20 unités/mg.

L'enzyme obtenu est homogène en centrifugation analytique et ne contient, en électrophorèse sur gel d'acrylamide, aucun contaminant excédant 5 % de la composante Tryptophanase.

PURIFICATION DE LA TRYPTOPHANASE DE *ESCHERICHIA COLI* PAR LA CENTRIFUGATION ZONALE *

par J. LONDON et M. E. GOLDBERG

Service de Biochimie cellulaire — Institut Pasteur
Paris

INTRODUCTION

L'étude que nous avons entreprise avait pour but d'utiliser la centrifugation zonale pour purifier un enzyme bactérien. Cet enzyme est la Tryptophanase d'*E. coli*. C'est un tétramère de poids moléculaire 220 000, portant 4 sites pour son coenzyme, le PLP (pyridoxal phosphate) ; le coefficient de sédimentation de l'Holo-enzyme à 20° C est $S_{20,w} = 10,3$ S.

Cet enzyme, étudié par Snell *et coll.*, est purifié dans ce laboratoire par des précipitations successives au sulfate d'ammonium (1). Les auteurs obtiennent ainsi en cinq étapes un enzyme pur et cristallisable. Pour des raisons techniques assez mal définies, la purification par cette méthode n'a pas été parfaitement reproductible et nous avons préféré utiliser une purification basée essentiellement sur une centrifugation en gradient linéaire de sucrose.

I. - PROCEDE EXPERIMENTAL

Nous disposons d'une centrifugeuse MSE Super Speed 65 et d'un rotor B XIV en titane dont la capacité est d'environ 650 cc.

* European Symposium of zonal centrifugation in density gradient. Edit. Cité Nouvelle, Paris, 1974, p. 122.

La pompe à gradient, qui nous permet d'obtenir un gradient linéaire de sucrose entre 5-20 % et entre 10-30 %, est une « High Capacity Gradient Pump » fabriquée par Beckman.

Le gradient linéaire est fait dans le tampon suivant :

Tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,8.

— Mercaptoethanol : 5 mM

— Ethylène-diamine tetraacetic acide (EDTA) : 2 mM

— Pyridoxal phosphate 0,04 mM

Le mélange protéique est un extrait brut d'une souche 3000 K12 d'*Escherichia coli* pleinement induite par le tryptophane, débarrassé des acides nucléiques ; il se trouve dans le tampon décrit ci-dessus. On injecte, dans le rotor, le gradient linéaire de sucrose, en environ 30' à 3 000 rpm, puis on injecte dans ce gradient environ 30 à 40 ml de mélange protéique contenant de 200 à 500 mg de protéines. On fait alors tourner le rotor en centrifugation zonale à 45 000 rpm à 15° C et pendant 16 h à 22 h suivant les cas.

La collecte de cette centrifugation se fait en injectant du sucrose à 25 % ou 35 % par le fond.

On collecte ainsi manuellement environ 25 fractions de 30 ml chacune. Cette collecte dure 15' environ et est extrêmement facile. Les déterminations de concentration de protéine et d'activité enzymatique se font aussitôt après la collecte. On détermine la concentration de protéine à 278 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss. On détermine l'activité enzymatique Tryptophanase selon la méthode de Newton *et coll.* (2). Le dosage n'est précis qu'à 10 % près. On a parallèlement déterminé une autre activité enzymatique portée par la Tryptophanase qui est l'activité sérine désaminase déterminée par la méthode de Newton *et coll.* (2). D'autre part, on a utilisé comme marqueur de sédimentation, la β -galactosidase qui a un coefficient de sédimentation de 16 S et qui a été dosée enzymatiquement selon la méthode de Ullmann *et coll.* (3).

Quatre-vingt-quinze pour cent de l'activité Tryptophanase se retrouvent dans 150 ml environ. Ce pool récupéré est alors concentré par différentes méthodes ; une fois concentré, l'enzyme déjà purifié est précipité au sulfate

d'ammonium. On obtient ainsi un enzyme de haut degré de pureté et stable pendant plusieurs jours.

Les critères de pureté de l'enzyme sont :

- son activité spécifique ;
- son spectre d'absorption ;
- sa migration homogène en gel d'acrylamide ;
- son coefficient de sédimentation ;
- ses propriétés de cryosensibilité.

II. - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Pour la brièveté de ce compte rendu, nous avons choisi de reporter les résultats expérimentaux d'une seule purification de Tryptophanase par centrifugation zonale. Les résultats se trouvent dans le tableau I et les figures A et B.

L'extrait brut est obtenu à partir d'une culture d'*Escherichia coli* souche K12 3000 sauvage, pleinement induite par du Tryptophane en milieu riche (milieu L¹). Au bout de 8 h de croissance à 37° C, cette culture est lavée avec le tampon A décrit ci-dessus. On casse les bactéries à l'aide d'un sonicateur Brönson. On centrifuge à 10 000 rpm dans une centrifugeuse Sorvall pendant 15' pour enlever les débris bactériens. On obtient ainsi 80 ml d'un extrait brut à 1,5 unité/mg de Tryptophanase. La Tryptophanase correspond alors à 7 % des protéines totales.

Avant la centrifugation zonale, on purifie partiellement cet extrait brut par les étapes suivantes :

— Elimination des acides nucléiques par précipitation de ceux-ci à l'aide d'une solution de sulfate de protamine (0,7 ml pour 100 ml d'extrait, d'une solution aqueuse à 2 % de sulfate de protamine à pH 5).

— L'extrait brut débarrassé des acides nucléiques est chauffé à 65° C pendant 5' en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dans l'exemple du tableau I, on perd 25 % de l'activité par ce traitement, mais d'autres purifications nous montrent

1. Composition du milieu L :

1 litre d'eau distillée, 10 g de Bactotryptone, 5 g de « Yeast Extract », 5 g de Chlorure de sodium et de l'hydroxyde de sodium pour amener le pH à 7,3.

qu'on peut perdre moins de 10 % de l'activité sans changer ce traitement. Les protéines dénaturées sont éliminées par centrifugation dans un rotor Sorvall SS 34 à 15 000 rpm.

— Le surnageant chauffage est alors précipité au sulfate d'ammonium à 55 % de saturation. Nous obtenons, dans cet exemple de purification, la majeure partie de l'activité dans le précipité ; mais, dans d'autres purifications, cela n'a pas été le cas. C'est la raison pour laquelle nous avons omis cette étape dans certaines autres purifications, d'autant plus que, comme le montre le tableau I, nous sommes obligés de dialyser le précipité sulfate d'ammonium pour

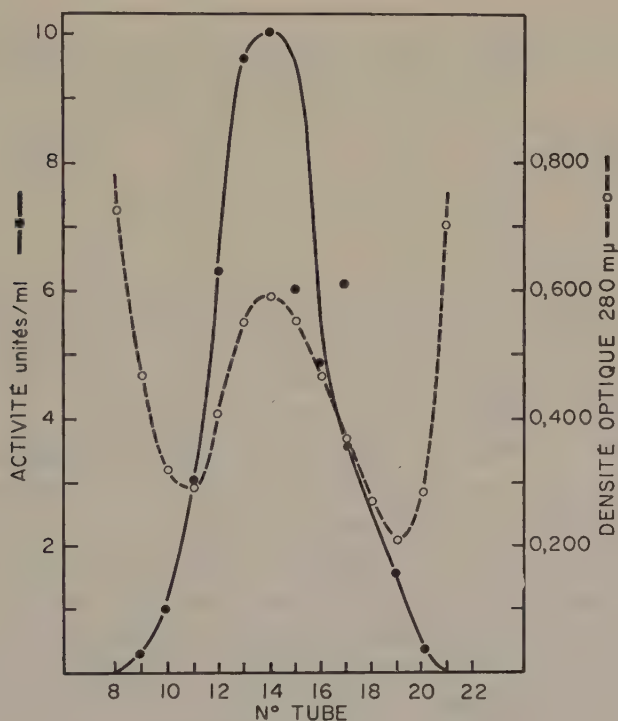


Fig. A

enlever le sel dont la grande densité gênerait considérablement la centrifugation zonale.

— Pour la centrifugation zonale, on dépose donc au sommet d'un gradient 10-30 %, 45 ml de mélange protéique à 5 unités/mg et contenant 315 mg de protéines.

Il est à noter que dans cet exemple, le gradient de

sucrose est de 10-30 % et non de 5-20 % comme dans d'autres purifications ; ainsi nous pouvons centrifuger une plus grande quantité de protéines.

Centrifugation et collecte

On centrifuge 22 h à 15° C et 45 000 cpm.

La collecte manuelle donne 25 fractions de 30 ml comme le montre la figure A. La tryptophanase sort au tube 14 auquel correspond d'ailleurs aussi un pic protéique. Nous avons pu vérifier que le profil d'élution en activité sérine désaminase correspond exactement à celui de l'activité tryptophanase.

Nous avons pu vérifier lors d'une autre centrifugation zonale que le coefficient de sédimentation de l'espèce tryptophanase est de 10 S environ, ce qui est bien en accord avec celui donné par Snell *et coll.* dans la littérature.

Nous avons rassemblé les fractions 11, 12, 13, 14, 15, 16 ; on obtient 170 ml à 12,3 unités/mg.

Le problème est alors de concentrer ces 170 ml qui ne contiennent que 0,55 mg/ml de protéine mais qui par contre contiennent beaucoup de sucrose. Etant donné la faible concentration en protéine, on ne peut précipiter cet échantillon protéique au sulfate d'ammonium.

Enfin, on ne peut pas enlever le sucrose par simple dialyse car on constate qu'il y a une assez forte dénaturation de la tryptophanase dans ces conditions.

Pour concentrer la Tryptophanase à partir du pool des fractions zonales, on a choisi de centrifuger ce pool très longtemps et à grande vitesse. Ainsi, on centrifuge ces 170 ml à 57 000 rpm à 10° C et pendant 48 h dans un rotor MSE (8 × 35 ml, en titane).

On recueille au fond des tubes un précipité jaune (le surnageant est incolore).

Ce précipité est dissous dans du tampon A. On obtient ainsi 24 ml à 45 unités/ml, soit 1 045 unités, ce qui montre que cette centrifugation est très commode, puisqu'elle permet de concentrer d'un facteur 7 avec un rendement de 95 %.

Cette solution protéique est alors précipitée avec du sulfate d'ammonium saturé et neutralisé.

On obtient alors 40 ml de solution protéique à 1,8 mg/ml et 20 unités/mg avec un rendement de 62 % par rapport à l'activité totale de l'extrait brut utilisé pour cette purification.

La figure B montre le spectre d'absorption de cet échantillon protéique à 20 unités/mg avec les deux pics caractéristiques du pyridoxal phosphate lié à l'enzyme (335 nm et 420 nm). D'autre part, l'absorption à 278 nm permet de calculer le coefficient d'extinction molaire soit $\epsilon \frac{\text{mg/ml}}{278 \text{ nm}} = 0,867$, ce qui correspond à ce qui est décrit par Snell.

Nous avons vérifié, par gel d'acrylamide, que l'échantillon ainsi obtenu était pur à 98 %.

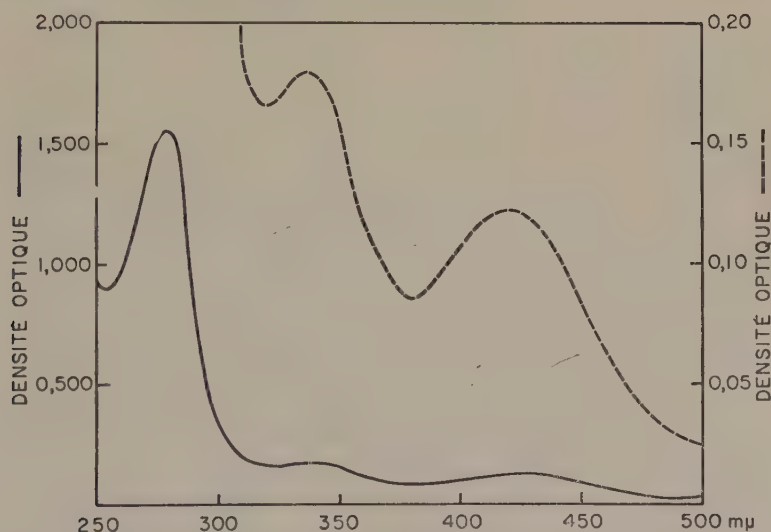


FIG. B

III. - AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE CETTE METHODE

A) AVANTAGES

Cette méthode est très reproductible

Nous obtenons les mêmes taux de purification et les mêmes rendements, que nous mettions sur le gradient de sucrose un extrait brut seulement débarrassé des acides

TABLEAU I
PURIFICATION DE LA TRYPTOPHANASE
(13 - 10 - 71)

Etapas	Volume	Concentration en protéine	Protéines totales	Unités/ml	Activité totale unités	Rende- ment	Activité spécifique unités/mg	Taux de purifi- cation
Extrait brut	78 ml	20 mg/ml	1 560 mg	30	2 340	100 %	1,5	
Surnageant sulfate de protamine ..	160 ml	7,5 mg/ml	1 200 mg	17	2 720	100 %	2,2	
Surnageant chauffage	160 ml	3 mg/ml	480 mg	10	1 600	68 %	3,3	2
Précipité chauffage	100 ml	4 mg/ml	400 mg	4,2	420			
55 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (précipité)	132 ml	11,4 mg/ml	365 mg	67	2 140	88 %	6	4
Surnageant 55 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	180 ml	1,2 mg/ml	234 mg	0,05	9			
Dialysat [précipité 55 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] ..	45 ml	7 mg/ml	315 mg	35	1 575	68 %	5	
Sortie centrifugation zonale	170 ml	0,55 mg/ml	93,5 mg	6,8	1 156	49 %	12,3	8,2
Précipité pool zonal	24 ml			45	1 045			
Précipité 90 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40 ml	1,8 mg/ml	72 mg	36	1 440	62 %	20	13,3

nucléiques ou un extrait brut déjà partiellement purifié. D'autre part, un gradient linéaire de sucrose entre 5 et 20 % ou entre 10 et 30 % convient aussi bien à cette purification.

Enfin bien que nous n'ayons qu'un seul exemple, la température de centrifugation — entre 4° C et 15° C — ne semble pas avoir d'effet sur les résultats de cette méthode.

Le tableau II montre sept purifications faites dans des conditions différentes et à partir de solutions protéiques préparées légèrement différemment. On peut constater la bonne reproductibilité des résultats.

— *Cette méthode est efficace :*

Les rendements oscillent entre 70 % et 90 % (rendement de la centrifugation zonale proprement dite à 15° C).

Le taux de purification oscille entre 2 et 5. Ces taux peuvent paraître faibles pour un cas classique, mais il faut se rappeler que, dans les conditions où l'on travaille, un taux de purification de 15 à partir de l'extrait brut donne un enzyme pur à 98 %. Un taux de purification entre 2 et 5, pour la centrifugation zonale est donc un taux très élevé pour nous. Il faut noter, par ailleurs, que le taux de purification par centrifugation zonale est plus faible si l'extrait brut est partiellement purifié auparavant.

L'activité spécifique obtenue en fin de purification est élevée et correspond à un enzyme pur à 95 %.

— *Cette méthode permet de travailler sur de grandes quantités de protéines.*

C'est l'un des plus grands avantages de la méthode de centrifugation zonale que de pouvoir travailler sur des quantités de protéines élevées. Notons également que le fait d'utiliser un gradient linéaire de 10 à 30 % de sucrose permet d'améliorer la méthode, puisque l'on peut déposer jusqu'à 400 mg de protéines.

— *Au cours de la centrifugation zonale, il n'y a pas d'inactivation de l'enzyme* ce que l'on peut vérifier par le rendement élevé.

— *Cette méthode est simple.*

TABLEAU II

RESULTATS DE DIVERSES CENTRIFUGATIONS ZONALES POUR LA PURIFICATION
DE LA TRYPTOPHANASE

	Unités/mg avant centrifugation	Activité totale avant centrifugation	Gradient	° C centrifugation	Durée de centrifugation	Unités/mg après centrifugation	Taux de purification	Activité totale après centrifugation	Rendement
17/12/70	2,0	1 080	5-20 %	4° C	18 h	9,0	4,5	579	57 %
19/12/70	2,0	806	5-20 %	15° C	18 h	9,6	5	738	91 %
13/05/71	2,5	1 080	5-20 %	15° C	16 h 30	9,0	3,6	800	80 %
25/05/71	1,6	1 472	5-20 %	15° C	17 h 30	9,0	5,6	1 260	86 %
1/06/71	3,3	1 160	5-20 %	15° C	18 h	11,5	3,8	720	72 %
13/10/71	5	1 575	10-30 %	15° C	22 h	12,3	2,4	1 420	90 %
25/05/72	4,5	3 000	10-30 %	15° C	21 h	11,6	2,5	2 000	66 %

La collecte manuelle se fait en quinze minutes, les résultats protéiques et enzymatiques sont obtenus ensuite en une heure.

La concentration du pool obtenu après centrifugation zonale se fait très simplement et sans inactivation de l'enzyme.

— *Analogie avec les résultats obtenus par Snell et coll.*

Le tableau III montre la comparaison entre l'une de nos purifications et celle publiée par Snell. L'analogie est tout à fait satisfaisante.

B) INCONVENIENTS

— Bien que l'on puisse déjà travailler sur d'assez grandes quantités de protéines (500 mg), ces quantités sont encore nettement plus faibles que celles utilisées par Snell *et coll.* (5 000 mg).

— On obtient, après centrifugation zonale, une solution protéique très peu concentrée. Heureusement, cet inconvénient majeur a pu être surmonté.

CONCLUSION

Le travail décrit ci-dessus a montré comment la centrifugation zonale peut être un outil tout à fait remarquable pour purifier un enzyme soluble.

Nous pensons que cette méthode peut être généralisée comme étape d'un grand secours dans les purifications d'autres enzymes à condition que ceux-ci soient suffisamment stables lors de centrifugation et qu'ils aient, soit usuellement, soit dans des conditions de force ionique ou de pH particuliers, un coefficient de sédimentation pas trop commun.

BIBLIOGRAPHIE

1. NEWTON, W., MORINO, Y., and SNELL, E.E. *J. Biol. Chem.* 240, (1965) 1211.
2. NEWTON, W., and SNELL, E.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51 (1964).
3. ULLMANN, A., JACOB, F., and MONOD, J., *J. Mol. Biol.*, 32, (1968), 1.

TABLEAU III

METHODE DE SNELL					METHODE DE CENTRIFUGATION ZONALE			
	Activité totale	Rendement	Activité spécifique	Taux de purification	Activité totale	Rendement	Activité spécifique	Taux de purification
Extrait brut	12 770	100 %	2,8	1	2 340	100 %	1,5	1
Surnageant protamine	10 530	83 %	3,9	1,4	2 720	> 100 %	2,2	1,5
Chaufrage (65° C - 5 mn)	10 573	83 %	6,4	2,3	1 600	68 %	3,3	2
Sulfate d'Ammonium 55 %					2 140	88 %	6	4
Sulfate d'Ammonium 50%-65 %	8 340	68 %	18	6,4				
Première cristallisation	8 190	65 %	22,5	8,9				
Sortie centrifugation zonale					1 156	49 %	12,3	8,2
Précipité pool zonal					1 440	62 %	20	13,3

Depuis ces premières purifications, quelques améliorations ont été apportées par A. et O. Raibaud.

L'enzyme est à présent préparé à partir de la même souche Hfr 3000 d'*E. coli* K12, mais les cultures sont effectuées dans un fermentor de 15 litres.

De plus, avant la centrifugation zonale qui n'est pas modifiée, on fait subir à la préparation une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium entre 47 % et 62 % de saturation.

L'enzyme obtenu à l'issue de la centrifugation zonale a une activité spécifique de 24 unités/mg ; il est homogène en centrifugation analytique et l'électrophorèse en gels d'acrylamide en présence de sodium Dodecyl-sulfate montre qu'il n'y a aucune impureté excédant 5 % de la composante Tryptophanase.

La cristallisation de l'apoenzyme a été mise au point par O. Raibaud ; les cristaux ont la forme de paillettes allongées.

L'enzyme est conservé dans des ampoules scellées sous atmosphère d'azote, à 4° C et à l'abri de la lumière.

Lorsqu'on laisse cet enzyme en présence d'oxygène, même à 4° C, il s'inactive rapidement (80 % en 21 jours). Cette inactivation, due à l'oxydation des groupements sulfhydryles, est totalement préservée par chauffage à 50° C en présence de dithiothreitol 10^{-2} M et de sulfate d'ammonium 5 %.

Le fait que l'enzyme sur lequel nous avons travaillé avait une activité de 20 unités/mg seulement n'est pas dû à son manque de pureté, mais à son inactivation partielle par oxydation de certains groupements sulfhydryles (A. et O. Raibaud, communication personnelle). Le travail présenté ici a donc été effectué sur un enzyme de pureté satisfaisante.

CHAPITRE II

PROPRIETES PHYSIQUES ET STRUCTURE QUATERNAIRE

Disposant de Tryptophanase dont le degré de pureté était satisfaisant, nous pouvions aborder les problèmes physico-chimiques que nous nous étions posés. Parmi ceux-ci le premier était le paradoxe apparent que constituait, selon Morino et Snell (1967), la structure quaternaire de la Tryptophanase d'*E. coli* B, à savoir l'existence au sein d'un tétramère de huit chaînes polypeptidiques chimiquement identiques, mais structuralement et fonctionnellement différentes deux à deux par rapport à la fixation du coenzyme.

Or, dans la plupart des oligomères, chaque sous-unité identique porte un site de fixation du ligand. Il existe cependant quelques exemples où le nombre de sites de fixation des ligands est inférieur au nombre de chaînes polypeptidiques : citons pour exemples l'UDP galactose épimérase (1 DPN/2 chaînes), la thréonine désaminase de *Salmonella thyphimurium* (2 PLP/4 chaînes).

Les deux hypothèses émises pour expliquer ces faits sont :

- soit une différence de conformation des deux chaînes,
- soit une forte coopérativité négative entre les sous-unités telle que la fixation du ligand sur l'une abolisse pratiquement l'affinité de l'autre pour ce même ligand.

Notre but initial était donc de déterminer la stoechiométrie des sous-unités et le nombre de sites de fixation du PLP, avant de chercher à expliquer le paradoxe des huit chaînes polypeptidiques.

Les résultats de ce travail, ainsi que leur discussion, sont décrits dans l'article ci-joint. Il est démontré que la Tryptophanase d'*E. coli* K12 est un tétramère formé de quatre chaînes polypeptidiques seulement, portant chacune un site de fixation pour le pyridoxal phosphate.

THE TRYPTOPHANASE FROM *ESCHERICHIA COLI* K-12

I. PURIFICATION, PHYSICAL PROPERTIES, AND QUATERNARY STRUCTURE *

Received for publication, September 17, 1971) ⁽¹⁾

JACQUELINE LONDON AND MICHEL E. GOLDBERG

*From the Département de Biologie Moléculaire, Institut Pasteur,
Paris-XV^e, France*

SUMMARY

The quaternary structure of *Escherichia coli* K12 tryptophanase, obtained by a new purification procedure, was studied. The enzyme was shown to be a tetramer of molecular weight 223,000, made of four polypeptide chains. The apoenzyme dissociates reversibly to dimers at low temperature and the apotetramer, observed at room temperature, undergoes a significant change in conformation upon binding the coenzyme (pyridoxal 5'-phosphate).

The tryptophanase from *Escherichia coli* B, which catalyzes several reactions (1), has been shown to require pyridoxal 5'-phosphate as a coenzyme. Some physical-chemical properties of this enzyme have been examined by Morino and Snell (2, 3). One of the most striking properties they were able to show is that the enzyme is made of eight

*This work was carried out in the Département de Biologie Moléculaire of the Institut Pasteur and supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, the Université de Paris VII, the Commissariat à l'Energie Atomique, and the National Institutes of Health.

(1) J. Biol. Chem., vol. 247, n° 5, p. 1566 (1972).

identical polypeptide chains whereas, functionally, it behaves as a tetramer; only four binding sites for pyridoxal-P can be detected. This finding led to the proposal of two interesting structural models; either the polypeptide chains become differentiated during the formation of the quaternary structure into a class which binds pyridoxal-P and another which does not, or a duplication of the structural gene for tryptophanase leads to two very similar but functionally different polypeptide chains which combine in a 1:1 ratio to form the tryptophanase protomer.

A genetic approach could conceivably help in elucidating the quaternary structure of this enzyme. Since genetic experiments are much easier to perform with strain K12 than with strain B, and since most enzymes from the two strains are practically identical, this approach could be applied to the tryptophanase from strain K12. Some results obtained by sucrose gradient centrifugation (4, 5) indicate that the tryptophanase from the two strains have very similar over-all properties. However, a more precise study of the quaternary structure of the K12 enzyme had to be performed.

We report a new and simple purification method and discuss some properties of the K12 tryptophanase which show that (a) the over-all hydrodynamic properties of the enzymes from *E. coli* B and K12 are extremely similar, and (b) the tryptophanase from K12 is a real tetramer, containing only four polypeptide chains. The possible reasons of the discrepancy between our results and those reported by Morino and Snell (3) are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Tryptophanase Purification—*E. coli* K12, wild type strain 3.000, was grown at 37° in ML medium¹ supplemented with 2 mg per ml of L-tryptophan in Fehrenbach vials containing 500 ml of culture medium, and vigorously shaken. The medium was inoculated with 1 ml of cells in the resting phase. The growing cells were harvested after 8 hours. These conditions are essential for reaching

1. ML medium consists of 1 liter of distilled water, 10 g of Bactotryptone, 5 g of yeast extract, 5 g of sodium chloride, and enough sodium hydroxide to bring the pH up to 7.3.

a high specific activity². The cells were centrifuged, washed with 10^{-1} M potassium phosphate, pH 7.8, 5×10^{-3} M mercaptoethanol, 2×10^{-3} M EDTA, and 5×10^{-5} M pyridoxal-P (Buffer A) and resuspended in the same buffer (1 g of wet cells/8 ml of buffer).

The crude extract was obtained by sonication of the suspension for 15 min with a Brönson sonifier. Cell debris was removed by centrifugation for 30 min in a SS-4 Sorvall centrifuge at 15,000 rpm. The supernatant was treated with a solution of 2% protamine sulfate adjusted to pH 5.0 with potassium hydroxide. The protamine sulfate solution (7 μ l) was added per mg of total protein in the crude extracts. After standing for 30 min, the precipitate was removed by centrifugation as above.

The supernatant was then layered on a 5 to 20% sucrose gradient in Buffer A and centrifuged for 17 hours at 45,000 rpm and 15° in a Measuring and Scientific Equipment (Crawley, England) Superspeed 65 ultracentrifuge equipped with a B XIV Ti zonal rotor. After sedimentation the gradient is collected, starting from the top, in 30 ml fractions. The fractions retained for further purification were pooled, dialyzed overnight against 5×10^{-3} M potassium phosphate, pH 7.8, 5×10^{-3} M mercaptoethanol, 2×10^{-3} M EDTA, and 5×10^{-5} M pyridoxal-P. The protein solution was lyophilized and resuspended in a few milliliters of Buffer A. Finally, the protein solution was slowly brought to 65% saturation with finely ground ammonium sulfate. The suspension was centrifuged, the supernatant discarded, and the precipitate dissolved in the minimum volume of Buffer A.

Unless otherwise stated, all steps were carried out at 4°.

Enzyme Assay—The assay was performed as described by Newton *et al.* (1).

Protein Assay—Protein concentrations were measured by the procedure of Lowry *et al.* (6).

Analytical Centrifugations—These were performed on a Spinco model E analytical ultracentrifuge, using the interference or the absorption-scanning optical system for molecular weight measurement, and the Schlieren optical

2. J. London, C. Skrzynia, and M. E. Goldberg, manuscript in preparation.

system for sedimentation coefficient determinations. Molecular weights were determined by sedimentation equilibrium at low and high speeds by means of the "white light" method described by Goldberg and Edelstein (7) when the interference optical system was used. The molecular weight of the denatured protein was determined in 6 M guanidine hydrochloride using the same partial specific volume as in water (8). The value assumed was $0.735 \text{ cm}^3 \text{ per g}$ (5).

Buffers Used for Centrifugation—Sedimentation coefficient measurements described as suitable for studying the cryodissociation of tryptophanase (2) were performed in the following buffer which consisted of $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ imidazole-HCl, pH 8.0, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ EDTA, $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ mercaptoethanol, and 10^{-1} M KCl. Sedimentation equilibria were performed in Buffer A for determination of the molecular weight of the holoenzyme and in 6 M guanidine hydrochloride in Buffer B ($2 \times 10^{-2} \text{ M}$ Tris-HCl, 10^{-2} M EDTA, 10^{-2} M NaCl, and 10^{-1} M mercaptoethanol, pH 7.4) (8) for determination of the molecular weight of the individual polypeptide chains.

Preparation of Apotryptophanase and Reduced Tryptophanase—Apotryptophanase (devoid of pyridoxal-P) was prepared by treatment with DL-penicillamine (2) and the holoenzyme (tryptophanase with bound pyridoxal-P) was reduced with sodium borohydrate (9).

Gel Electrophoresis—Disc electrophoresis on polyacrylamide gels was performed in the presence of sodium dodecyl sulfate for molecular weight determinations according to Shapiro *et al.* (10).

RESULTS

Purification—The results of the zonal centrifugation are shown in fig. 1. The fractions retained for further purification are those between the *arrows*. The results of a typical purification are shown in table I. The enzyme obtained by this procedure appears homogenous by centrifugation and at least 95 to 98% pure by electrophoresis on polyacrylamide gels.

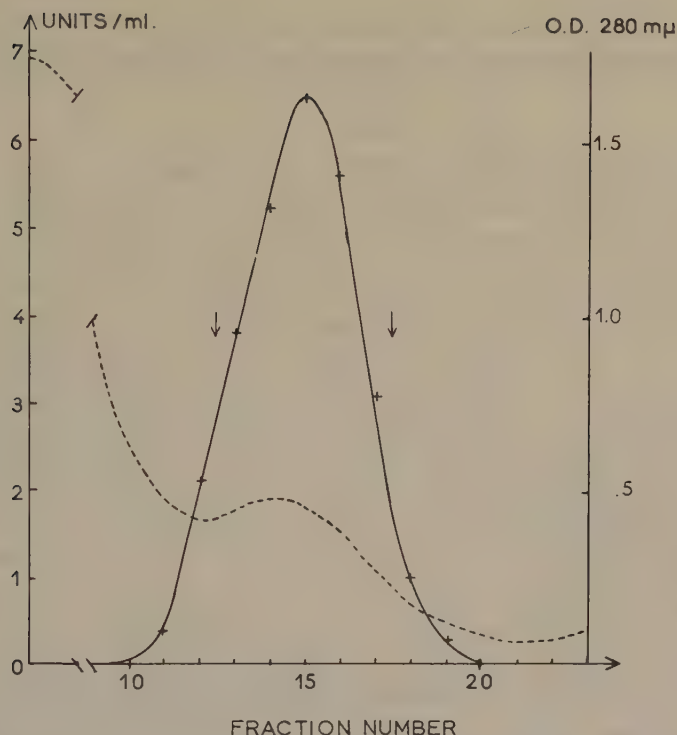


FIG. 1. — Zonal centrifugation. Conditions are described under “Materials and Methods”. —, activity; ----, optical density (O. D.) at 280 nm.

Sedimentation Properties of K12 Tryptophanase—The tryptophanase from strain B has the following unusual property: the holoenzyme (*i.e.* enzyme plus pyridoxal-P) remains in the tetrameric form at low temperature, whereas the apoenzyme undergoes a reversible dissociation to dimers at low temperature. Moreover, a significant increase in sedimentation coefficient can be detected upon adding pyridoxal-P to the tetrameric apoenzyme (*i.e.* at room temperature). In order to compare the tryptophanase from strains B and K12 the dissociation of the latter enzyme was studied by measuring the sedimentation properties of the holo- and apoenzymes at 4.5° and 22°.

The holoenzyme, when sedimented at 4.5° in the presence of 0.5 mM pyridoxal-P, had a sedimentation of 6.71 S. After the usual viscosity and density corrections, the value for the sedimentation coefficient in water at 20° was $s_{20,w} = 10.35 \pm 0.5$ S, a value very similar to that

described by Morino and Snell (2). The same value was obtained when the centrifugation was performed at 22°.

TABLE I

Purification of tryptophanase

This purification was performed on 5 g of cells.

STEPS	Volume	Activity	Total protein	Specific activity	Yield
	ml	units/ ml	mg/ml	units/ mg	%
Crude extract	45	29	15.5	1.85	100
Protamine sulfate ..	46	29	9	3.2	100
Zonal centrifugation	150	4.9	0.37	13	64
Lyophilization	10	75	5.5	13.7	64
Ammonium sulfate	10	72	4.8	15	62

The apoenzyme was also sedimented at 4.5° and 22° in the absence of pyridoxal-P. After extrapolation to zero protein concentration the corrections for viscosity and density were applied. The values obtained were $s_{20,w} = 6.21 \pm 0.5$ S at 4.5° and $s_{20,w} = 9.38 \pm 0.5$ S at 22°. These values are again in good agreement with those reported by Morino and Snell (2) and show that the K12 tryptophanase, like the B enzyme is cryolabile (*i.e.* dissociated, presumably to dimers, at low temperature) and that the tetrameric apoenzyme undergoes, upon reconstitution, a structural change which is accompanied by a rather large increase in sedimentation coefficient from 9.4 S to 10.35 S.

The sedimentation coefficient of the reduced holoenzyme was identical, within experimental error, to that of the holoenzyme. Thus, the over-all structure of the enzyme is not drastically modified during the reduction. These results, and their counterpart for the *E. coli* B tryptophanase, are summarized in table II.

The comparison of the two sets of results indicates a great similarity of the hydrodynamic properties of the tryptophanase from the two strains.

Molecular Weight of Holoenzyme—The molecular weight of the native holoenzyme was determined by sedimen-

TABLE II
s_{20,w} for tryptophanase from *E. coli* B and K12

Protein and conditions	<i>E. coli</i> B	<i>E. coli</i> K12
	<i>S</i>	<i>S</i>
Holoenzyme	10.5	10.3
Reduced holoenzyme		10.3
Apoenzyme, 4.5°	6.0	6.2
Apoenzyme, 22°	9.5	9.4

TABLE III
Molecular weight of holoenzyme

Equilibrium was achieved 48 hours after full speed was reached. Temperature was 25°.

Centrifugation speed	Molecular weight	
	From interference pattern	From optical density at 420 nm
7,200	222,000	224,000
10,000	215,000	221,000

tation equilibrium at 25°. No extrapolation to zero protein concentration was undertaken since the initial concentration was only 0.2 mg per ml. The results obtained are shown in table III. The interference pattern of the higher speed run, when plotted as log (fringe displacement) *versus* r^2 , exhibited a slight upward curvature in the low concentration range. This could be interpreted as due to a small quantity of a low molecular weight contaminant. In order to obtain a more specific recording of the tryptophanase distribution across the centrifugation cell at equilibrium, the optical density at 420 nm was recorded as a function of the distance to the axis of rotation. This optical density is due to the

pyridoxal-P bound to the protein by a Schiff base link. A typical recording is shown in fig. 2. When $\log$ (optical density) was plotted as a function of r^2 a straight line was obtained throughout the cell. The molecular weight computed from the slope of this line is shown in table III. From these results we can conclude that the molecular weight of the holoenzyme is $223,000 \pm 5,000$, a value very close to that reported for the *E. coli* B enzyme.

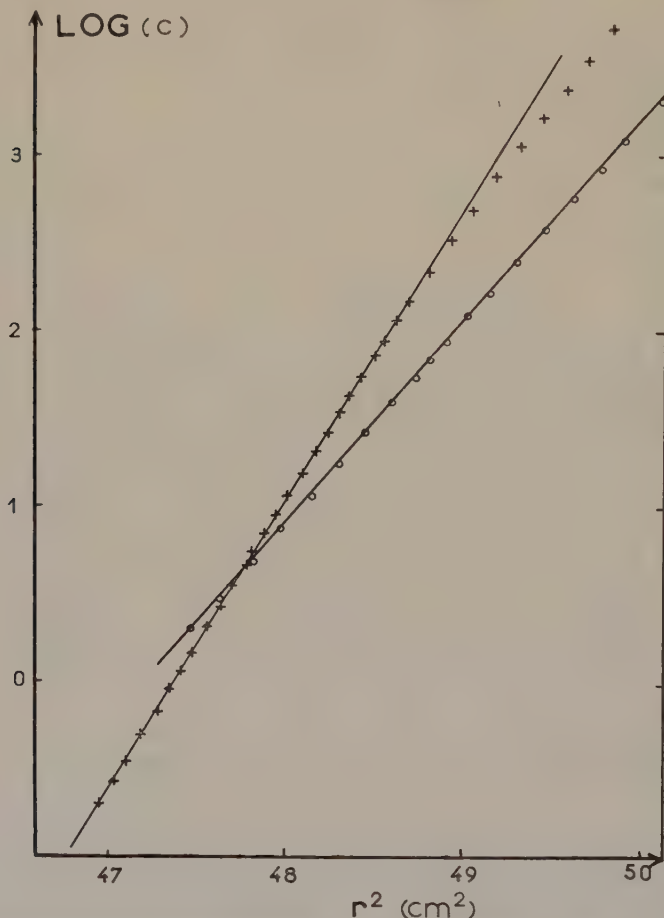


FIG. 2. Sedimentation equilibrium of tryptophanase. For holoenzyme ($\circ$ — $\circ$) centrifugation speed was 10,000 rpm. Diagram recorder 48 hours after reaching centrifugation speed. Initial protein concentration was 0.2 mg per ml. Temperature was 25°. Concentration (c) is expressed as optical densities at 420 mμ millimeters of pen deflection. For reduced and denatured holoenzyme ($\times$ — $\times$) centrifugation speed was 24,000 rpm. Diagram recorder 48 hours after reaching centrifugation speed. Initial protein concentration was 0.6 mg per ml. Temperature was 25°. Concentration (c) is expressed in millimeters of fringe displacement of the enlarged interference diagram.

Molecular Weight of Subunits—The molecular weight of the polypeptide chains contained in the whole tryptophanase molecule was determined by centrifugation to equilibrium in 6 M guanidine hydrochloride. In order to overcome the problem of some contaminant in the tryptophanase preparation, a specific optical marker was bound to the tryptophanase subunits; holoenzyme was reduced with sodium borohydride and then denatured in guanidine hydrochloride. The absorption at 330 nm was taken as characteristic of the reduced subunits. The results of a set of sedimentation equilibrium experiments are shown in table IV. From these results, it appears that the values obtained from interference patterns and from absorption at 330 nm are identical. Moreover, the plot of $\log c$ versus r^2 fits a straight line for low protein concentration on the interference diagram (fig. 2). Close to the bottom of the cell, an appreciable downward curvature could be detected, due to the high value of the second virial coefficient in guanidine hydrochloride (8). Thus, the low molecular weight impurity which could be detected in the nondenatured enzyme solution probably consisted of partially dissociated tryptophanase. A linear extrapolation of the reciprocal of the apparent molecular weight to zero protein concentration yields the value of the molecular weight of the tryptophanase subunits. The value found is $57,000 \pm 4,000$ (fig. 3).

TABLE IV

Molecular weight of tryptophanase subunits

Equilibrium was achieved after 48 hours at 24,000 rpm. Temperature was 25°.

Initial protein concentration	Apparent molecular weight	
	From interference	From optical density at 330 nm
<i>mg/ml</i>		
0.6	42,000	43,000
0.3	48,000	48,500
0.1	55,000	55,000

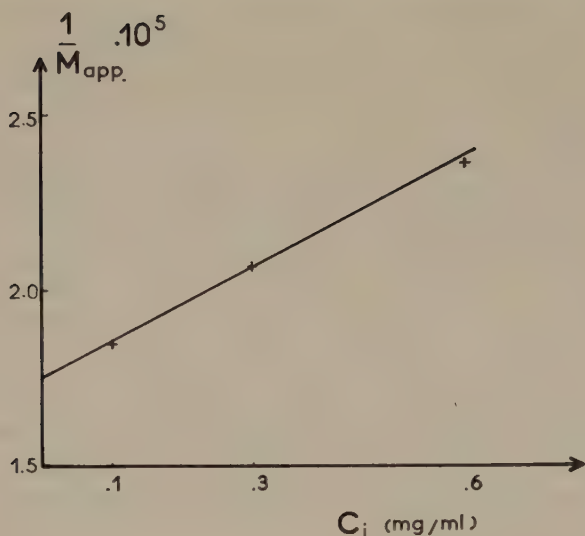


FIG. 3. — Determination of the tryptophanase protomer molecular weight. C_i is the initial protein concentration; M_{app} is the apparent molecular weight. Conditions are as described in the legend to fig. 2.

This result was checked by the less precise, but more direct techniques of electrophoresis on polyacrylamide gels in the presence of sodium dodecyl sulfate. The molecular weight markers used were ovalbumin, bovine serum albumin, and rabbit muscle phosphorylase (fig. 4). The tryptophanase preparation showed a single band, the migration of which corresponds to a molecular weight of $58,000 \pm 9,000$, confirming the results obtained by sedimentation equilibrium in guanidine hydrochloride. Thus, the native enzyme clearly contains only four polypeptide chains, presumably identical since, by comparison of the absorption of bound pyridoxal-P for the K12 and B enzymes, the two apoenzymes bind the same number of coenzyme molecules, *i.e.* four, according to Newton *et al.* (1).

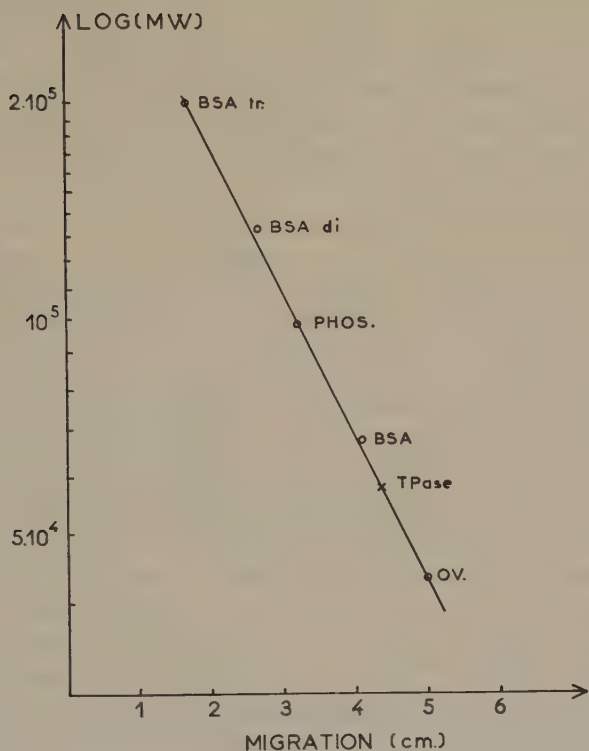


FIG. 4. — Gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *OV.*, ovalbumin; *PHOS.*, phosphorylase; *BSA*, *BSA di*, *BSA tr.*, bovine serum albumin monomer, dimer, and trimer.

DISCUSSION

The results reported clearly indicate that the tryptophanase from strain K12 has a molecular weight of 225,000, is made of four presumably identical polypeptide chains, and exhibits the same unusual conformational changes as the enzyme from strain B. The apoenzyme reversibly dissociates to dimers at low temperature and the sedimentation coefficient of the protein increases from 9.4 S to 10.3 S upon reconstitution of the holoenzyme. Furthermore, the amino acid compositions of the two tryptophanases (3 and 11) are very similar, except for serine and glutamic acid. Thus, the two enzymes seem to be practically identical with respect to their over-all functional properties. The sole difference resides in the constitution of the protomer.

Two alternative hypotheses can account for this difference; either the two proteins differ in their chemical structure or some experimental artifacts have interfered with the interpretation of the data on the *E. coli* B enzyme. The first hypothesis seems unlikely, since to our knowledge, only one enzyme (homoserine dehydrogenase II) has been shown to differ significantly in strains B and K12 (11); moreover, this difference can more easily be interpreted as the absence of the functional structural gene in strain B, rather than a differentiation of the structural gene between the two strains.

By contrast, the second hypothesis is supported by the following considerations. The sedimentation equilibrium was measured by Morino and Snell at only one protein concentration. In the presence of strong denaturing solvents like sodium dodecyl sulfate or guanidine hydrochloride and at extreme pH values, the apparent molecular weight is strongly dependent on protein concentration and the real molecular weight is always larger than the apparent molecular weight. Thus, extrapolation to zero protein concentration is essential for obtaining accurate values.

While this manuscript was being prepared, Dr. Snell was kind enough to send us a preprint of a paper in which he shows that, from revised chemical data, the *E. coli* B enzyme protomer is also made of only one polypeptide chain³.

From all these facts it can be concluded unambiguously that the tryptophanases from strains B and K12 are tetramers, functionally and structurally, as could be expected for symmetrical oligomers (13).

REFERENCES

1. NEWTON, W. A., MORINO, Y., and Snell, E. E. (1965) *J. Biol. Chem.* 242, 2793.
2. MORINO, Y., and Snell, E. E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2793.
3. MORINO, Y., and Snell, E. E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5591.
4. BURNS, R. O., and DE MOSS, R. D. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 65, 233.

3. An independent study of the chemical structure of *E. coli* B tryptophanase has been carried out by Kagamiyama *et al.* (12) with results essentially similar to those reported in this paper.

5. GOPINATHAN, K. P., and DE MOSS, R. D. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1223.
6. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
7. GOLDBERG, M.E., and EDELSTEIN, S.J. (1969) *J. Mol. Biol.* 46, 431.
8. ULLMANN, A., GOLDBERG, M.E., PERRIN, D., and MONOD, J. (1969) *J. Mol. Biol.* 46, 431.
9. MORINO, Y., and SNELL, E.E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2800.
10. SHAPIRO, A.L., VINDELLA, E., and MAIZEL, J.V. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815.
11. PATTE, J.C., LE BRAS, G., and COHEN, G. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 136, 245.
12. KAGAMIYAMA, H., WADA, H., MATSUBARA, H., and SNELL, E.E., (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1571.
13. MONOD, J., WYMAN, J., and CHANGEUX, J.P. (1965) *J. Mol. Biol.*

La stoéchiométrie des sous-unités a donc montré que la Tryptophanase d'*E. coli* K12 est un tétramère de 220 000 D, formé de 4 protomères de 55 000 D portant chacun une seule chaîne polypeptidique et un site de fixation du PLP.

Depuis les premiers travaux de Morino et Snell (1967), Kaganiyama *et al.* (1972) ont montré que la Tryptophanase d'*E. coli* B est également un tétramère formé de 4 chaînes polypeptidiques seulement portant chacune un site de fixation pour le coenzyme.

Les Tryptophanases des souches B et K12 apparaissent donc comme similaires du quart à leur structure quaternaire.

AUTRES CARACTERISTIQUES DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA TRYPTOPHANASE D'*E. COLI* K12

Morino et Snell (1967) avaient montré que l'Apoenzyme et l'Holoenzyme ont des propriétés hydrodynamiques très différentes et en particulier que l'Apoenzyme est cryosensible alors que l'Holoenzyme ne l'est pas.

Nous avons voulu vérifier certaines de ces caractéristiques sur la Tryptophanase d'*E. coli* K12.

Comme le montre le tableau ci-dessous, les propriétés de sédimentation de l'Apoenzyme et de l'Holoenzyme tétramérique sont assez différentes et confirment comme dans le cas de la Tryptophanase de *E. coli* B, une structure plus compacte pour l'Holoenzyme que pour l'Apoenzyme.

Cette modification structurale semble être caractéristique de la présence de PLP, puisque ni la pyridoxamine (PMP), ni la phosphopyridoxal Tryptophane (PPT) ne la provoquent.

De plus, nous avons confirmé qu'à 4° C l'Holoenzyme reste sous forme tétramérique, tandis que l'Apoenzyme se dissocie en dimères. La présence de Pyridoxal phosphate, qui à 20° C, stabilise l'Holoenzyme sous une forme plus compacte, induit dans les interactions quaternaires de celui-ci un incrément énergétique tel qu'il reste stable à 4° C.

CARACTERISTIQUES HYDRODYNAMIQUES DE LA TRYPTOPHANASE D'*E. COLI* K12

Conditions de centrifugation	Apoenzyme S _{20,w}	Holoenzyme S _{20,w}
$\Theta = 20^{\circ} \text{C}$ en présence d'ions K^{+}	9,3	10,3
$\Theta = 4^{\circ} \text{C}$ en présence d'ions K^{+}	6,1	10,3
$\Theta = 20^{\circ} \text{C}$ + Phosphate de Pyridoxamine 10^{-4}M	9,3	9,3
$\Theta = 20^{\circ} \text{C}$ + Phosphopyridoxal Tryptophane 10^{-5}M	9,3	9,3

Configuration spatiale des sous-unités

L'information directe sur l'arrangement géométrique des sous-unités ne peut être donnée que par l'étude aux rayons X et celle au microscope électronique ; cette dernière méthode a permis à Morino et Snell de suggérer que la Tryptophanase d'*E. coli* B posséderait une symétrie de type D_2 ou 222, c'est-à-dire qu'il y aurait un axe de rotation d'ordre 2 et 2 axes doubles qui lui seraient orthogonaux.

L'examen des différentes propriétés physico-chimiques nous permet d'émettre certaines hypothèses quant à la configuration spatiale des sous-unités de la Tryptophanase d'*E. coli* K12.

Le fait que l'Apoenzyme tétramérique se dissocie en dimères est une indication forte d'une symétrie D_2 (Matthews et Bernard, 1973). Un tel oligomère à symétrie ponctuelle D_2 , consiste en 4 protomères équivalents associés deux à deux par des liaisons isologues.

Le fait que le tétramère se dissocie en dimères et non en monomères suggère que les interactions stabilisant le tétramère sont isologues ; les unes, insensibles à la tempé-

rature (assurant la stabilité du dimère), les autres, cryosensibles, permettant la dissociation en dimères à froid.

Quant à l'Holoenzyme, il a une forme plus compacte et ne se dissocie qu'en présence d'agents très dénaturants. La configuration spatiale des sous-unités est donc soit la même que celle de l'Apoenzyme — c'est-à-dire D_2 — mais avec des interactions isologues renforcées assurant à la molécule une forme plus compacte, soit différente — de type C_4 —, ce qui impliquerait une réorganisation complète de la structure quaternaire lors de la reconstitution de l'Holoenzyme.

Cette dernière hypothèse est hardie. En effet, on ne possède, à l'heure actuelle, aucun exemple d'enzyme de type C_4 ; cependant, il n'existe pas non plus, du moins à notre connaissance, d'enzyme dont les propriétés hydrodynamiques — en absence et en présence de coenzyme — soient si différentes.

Il serait donc intéressant de pouvoir obtenir et l'Apoenzyme, et l'Holoenzyme, en cristaux suffisamment gros pour pouvoir en étudier la symétrie par diffraction des rayons X.

CHAPITRE III

PROPRIETES DE DENATURATION REVERSIBLE DE LA TRYPTOPHANASE

Pour étudier le couplage entre structure tertiaire et structure quaternaire d'une protéine oligomérique sans fonction de régulation, nous avons choisi d'obtenir des molécules hybrides de Tryptophanase, c'est-à-dire des tétramères dont certaines sous-unités seraient modifiées chimiquement et d'autres pas. Pour ce faire, nous avons mis au point un marquage spécifique et stoechiométrique de la Tryptophanase, et choisi de construire les hybrides par dissociation puis réassociation des tétramères dans un mélange contenant des molécules marquées et non marquées.

Il nous fallait au préalable trouver une technique permettant de dissocier et de réassocier les sous-unités de la tryptophanase. Nous avons choisi la technique de dénaturation réversible par l'urée.

Les premiers résultats obtenus nous ont incités à étudier plus systématiquement les propriétés de dénaturation réversible de l'enzyme. Nous avons tout d'abord utilisé la technique de dialyse tant pour la dénaturation que pour la renaturation.

Les résultats que nous avons obtenus font l'objet de l'article ci-dessous.

RENATURATION OF *ESCHERICHIA COLI* TRYPTOPHANASE AFTER EXPOSURE TO 8 M UREA

EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF NUCLEATION CENTERS

Jacqueline LONDON, Cécile SKRZY尼亚,
and Michel E. GOLDBERG *

Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris

(Received April 22/May 30, 1974)

The renaturation of *Escherichia coli* K12 tryptophanase after treatment with 8 M urea has been studied. It is shown that, during the renaturation process, an inactive as well as an active form of the protein can be obtained. The influence on the relative amounts of these two forms of factors such as temperature, the presence of the coenzyme, the protein concentration and the conditions for removal of urea has been investigated. The results obtained indicate that the inactive form is characterized by incorrect quaternary interactions occurring specifically between tryptophanase protomers. These findings are discussed in the general frame of the mechanism of protein folding, and are taken as an evidence for the existence of nucleation centers in the folding of tryptophanase.

Since the observation by White (1) and Anfinsen and Haber (2) that ribonuclease can be renatured after its complete unfolding with urea and reduction of its disulfides, many proteins have been successfully renatured by controlled removal of the denaturing agent. In spite of the many

* Eur. J. Biochem. (1974), 47, 409-415.

experimental studies reported, no general effect of various parameters (temperature, pH, ionic strength, *etc.*) on the yield and kinetics of the renaturation process has been observed: each protein responds differently to a change of these parameters during refolding. Yet, one observation appears to be rather general: the yield of renatured molecules from this process decreases at high protein concentration.

While setting up a renaturation procedure for *Escherichia coli* K12 tryptophanase, we observed that this oligomeric enzyme (3,4) follows the general behaviour mentioned above. Using this system, we undertook experiments aimed at understanding the mechanism by which the protein concentration affects the renaturation process. In this paper, we describe a procedure for renaturing tryptophanase from 8 M urea with a high yield, compare some kinetic and hydrodynamic properties of the native and renatured enzymes, and report experiments showing that the renaturation process can, under controlled conditions, result in specific, incorrect, quaternary interactions. These interactions are favoured at high protein concentration and lead to the formation of an inactive enzyme, thus decreasing the formation of an inactive.

The implications of these findings relevant to the mechanism of refolding of globular proteins are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Enzyme Source

Tryptophanase was purified from the wild-type strain (3000) of *E. coli* K12 as described earlier (4). The preparation thus obtained was tested for purity by specific activity, electrophoresis and ultracentrifugation; it was found to be at least 90% pure.

Activity Measurements

Tryptophanase Activity. The assay has been previously described (5). In some experiments 0.1 M 2-mercaptoethanol

Enzymes. Tryptophanase (EC 4.1.99.1); β -galactosidase (EC 3.2.1.23); alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1); yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1); calf liver catalase (EC 1.11.1.6).

was used, and since this reagent interferes with Ehrlich's reagent its concentration had to be reduced to less than 0.01 M before the solution was assayed. This was done by dialyzing the protein samples for 90 min against 0.1 M potassium phosphate pH 7.8, 5 mM 2-mercaptoethanol and 0.1 mM pyridoxal 5'-phosphate immediately before the assay. The assay was then reproducible within $\pm 10\%$.

Serine Deaminase Activity. 10 to 50 μg enzyme was incubated for 10—20 min at 37°C in 0.6 ml of the following reaction mixture: 0.1 M potassium phosphate pH 7.8, 0.2 M L-serine, 0.1 mM pyridoxal 5'-phosphate and 1 mM 2-mercaptoethanol. The reaction was stopped with 1 ml of Nessler's reagent and after 20 min, 2 ml of 2.5 M sodium hydroxide were added. The absorbance at 520 nm was recorded. This assay was reproducible to $\pm 2\%$. When apoenzyme preparations had to be tested, they were first incubated for 1 h at 37°C in 0.1 M potassium phosphate pH 7.8, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM pyridoxal 5'-phosphate and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ serum albumin to allow for reconstitution of holoenzyme.

Protein Concentration

Protein was determined either from the absorbance at 278 nm using an absorption coefficient of $\epsilon_{278\text{ nm}}^{0.1\%} = 0.795$ for the holoenzyme (unpublished results) and $\epsilon_{278\text{ nm}}^{0.1\%} = 0.850$ for the apoenzyme (6) or by biuret method (7) using serum albumin as a standard, when the protein concentration was above 1 mg/ml. For smaller protein concentrations, the procedure of Lowry (8) was used.

Denaturation-Renaturation Procedure

Denaturation was performed by dialysis at 4°C for 12 h against 0.1 M potassium phosphate pH 7.8 supplemented with urea (Merck) to 8 M and 2-mercaptoethanol to 0.1 M.

Renaturation was performed, unless otherwise stated by dialysis overnight at room temperature against 0.1 M potassium phosphate pH 7.8, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 2 mM EDTA and 0.1 mM pyridoxal phosphate.

The volume of the dialysate was always 1% or less of that of the dialysis buffer. The dialysis tubings were treated before use by boiling twice in 2% sodium carbonate, followed by boiling in 50% ethanol and washing with water; they were stored at 4° C in 2 mM EDTA in water.

Apo-Enzyme and Reduced Holo-Enzyme

Apo-enzyme was obtained by the penicillamine treatment described by Newton *et al.* (5). Sometimes this treatment had to be repeated twice to obtain satisfactory resolution of the coenzyme as estimated by measuring the tryptophanase activity in the absence of pyridoxal phosphate (5).

Reduced holo-enzyme was obtained by reduction of the holo-enzyme as described earlier (9).

Sucrose-Gradient Centrifugations

5 to 20% sucrose gradients were prepared in 5-ml tubes. The sample volume was 150 μ l. The centrifugations were performed at 4° C in a Spinco L-2 65B or in an M.S.E. Superspeed 65 Mark II ultracentrifuge at speeds and times indicated in the text. Fractions (8 drops) were collected by use of an M.S.E. tube piercer.

The markers used were: *E. coli* β -galactosidase (16 S), *E. coli* alkaline phosphatase (6.2 S), yeast alcohol dehydrogenase (7.4 S) and calf liver catalase (11.4 S).

Analytical Centrifugations

These were performed with a M.S.E. Centriscan 75. 20-mm light path, single-sector cells were used. Centrifugations were performed at 4° C and 55000 rev./min. Sedimentation was observed by use of the absorption scanning system at 280 nm.

RESULTS

Renaturation of urea denatured Tryptophanase

When a preparation of tryptophanase was submitted to the "denaturation-renaturation" process outlined under

Materials and Methods, the yield of activity varied considerably with the exact conditions under which the experiment was performed. Therefore the influence of several parameters on the renaturation process has been investigated.

Influence of Temperature

In order to study the influence of temperature on the refolding of tryptophanase, the renaturation step was conducted both at 4° C and at room temperature ($\approx 23^{\circ}$ C). No difference was observed in the yield at these two temperatures in the range of 2 to 400 μ g/ml of tryptophanase.

Influence of the Enzyme Concentration

Tryptophanase solutions at various concentrations were submitted to the urea treatment and subsequent renaturation. Fig. 1 shows the concentration dependence of the yield of the renaturation treatment; it can be seen that the yield decreases as the initial tryptophanase concentration increases. It can also be seen that, when the renaturation is performed below 5 μ g/ml of tryptophanase, the recovery of activity approaches 100%.

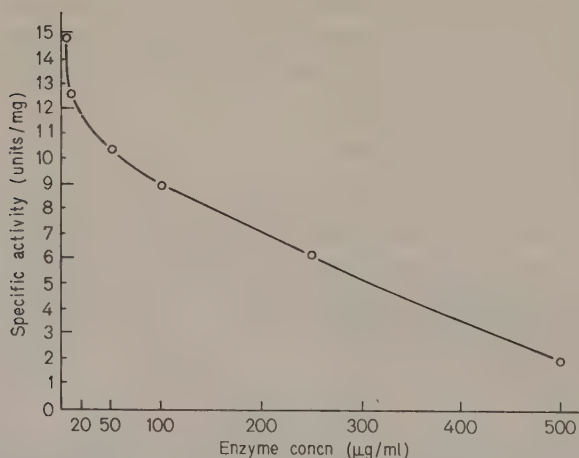


Fig. 1. *Concentration dependence of the renaturation yield.* The denaturation-renaturation process was performed as described under Materials and Methods in the presence of 500 μ g/ml serum albumin. The initial specific activity of the preparation was 16 units/mg.

Effect of Incubation at Intermediate Urea Concentrations

The results of refolding studies of various proteins have indicated that incubation at intermediate denaturing agent concentrations during the renaturation process may be critical for the yield of the renaturation (10, 11).

In order to know whether tryptophanase is sensitive to intermediate urea concentrations during its refolding, solutions of the enzyme were denatured in 8 M urea and then dialysed overnight at room temperature against a lower urea concentration.

The renaturation process was completed with a subsequent overnight dialysis against urea-free buffer. In fig. 2, it can be seen that incubation at around 3 M urea strongly prevents the correct refolding of tryptophanase.

In a control experiment, native tryptophanase (which had not been treated with 8 M urea) was dialysed, under similar conditions, first against 3 M urea and second against urea-free buffer. Over 80% of the initial activity was recovered after this treatment. It thus appears that the

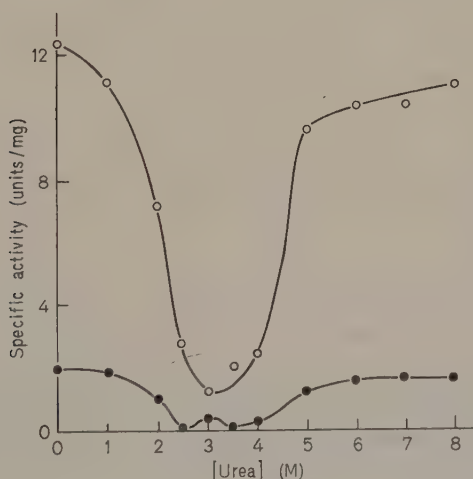


Fig. 2. *Effect of incubation at intermediate urea concentrations during the renaturation step.* The tryptophanase preparation (16 units/mg, 500 μ /ml) was denatured in 8 M urea as described in Methods, diluted to 20 μ g/ml with the buffer containing 8 M urea, and divided into equal fractions. Each fraction was dialysed against urea at one of the concentrations indicated and subsequently and L-serine deaminase (●—●) activities were assayed.

correctly folded tryptophanase is relatively stable in 3 M urea whereas the denatured protein tends to fold into an inactive conformation.

Influence of Pyridoxal 5'-phosphate

Since pyridoxal 5'-phosphate is known to modify the conformation (6), stability (12) and the quaternary interactions (6) of tryptophanase it seemed of interest to see whether this cofactor affected the refolding of the enzyme. For this purpose, the denatured enzyme was renatured in the presence of various concentrations of pyridoxal phosphate. As shown in fig. 3, no effect of the pyridoxal 5'-phosphate concentration could be detected between 0.01 and 0.5 mM. However, when the renaturation was conducted in the absence of coenzyme, the yield was slightly lower. This latter observation may probably be explained by the stabilizing effect of pyridoxal 5'-phosphate during the long dialysis, the holoenzyme being much more stable than apoenzyme. In any case, it appears that pyridoxal 5'-phosphate, which is known to stabilize the quaternary interactions within native tryptophanase (6), does not decrease the yield obtained by renaturation at high (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tryptophanase concentration.

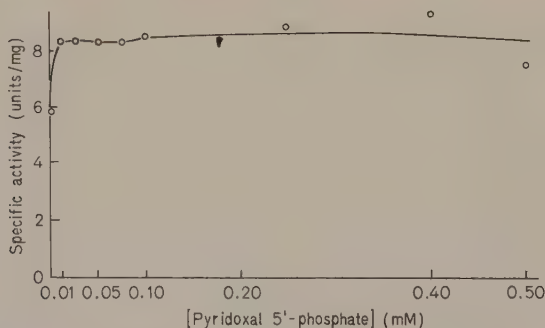


Fig. 3. *Effect of pyridoxal 5'-phosphate during the renaturation.* The renaturation was performed, at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of tryptophanase, in the presence of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ serum albumin. The pyridoxal-5'-phosphate concentration in the dialysis buffer was as indicated on the figure. The initial specific activity was 12 units/mg.

Properties of the renatured Tryptophanase

In order to ascertain that the enzyme obtained by the renaturation procedure described above is similar to native

tryptophanase, some of its enzymatic and physical properties were investigated.

Enzymatic Properties

The results presented for the renaturation step at low protein concentration indicate that the turnover number for tryptophan is of the same order of magnitude for native and renatured enzymes.

Assay of the L-serine deaminase activity of the two enzymes shows that the ratios of tryptophanase to serine deaminase activities are the same within experimental errors.

The Michaelis constant of the renatured enzyme for L-tryptophan has been determined. The value obtained ($K_m = 0.46$ mM) compares quite favorably with that determined for the native enzyme ($K_m = 0.6$ mM).

Hydrodynamic Properties

The tryptophanase from *E. coli* has a very characteristic sedimentation behaviour which reflects the stabilization of its quaternary structure by pyridoxal 5'-phosphate: while the holoenzyme sediments as a tetramer ($s_{20,w} = 10.5$ S) either at 4° C or 20° C, the apo-enzyme sediments as a dimer ($s_{20,w} = 6.3$ S) at 4° C and as a tetramer at 20° C (9.6 S). This cold-induced dissociation of the apo-enzyme is very sensitive to the presence of various ions as well as to the integrity of the apo-enzyme. It therefore appeared of interest to compare the sedimentation properties of the renatured and native tryptophanase.

For this purpose, renatured apo-enzyme and holo-enzyme were submitted to zone centrifugation in sucrose gradients prepared in imidazole-HCl. This buffer is known to permit the cryodissociation of native apotryptophanase. The conditions and results of such a centrifugation are described in fig. 4. It is seen that, like the native enzyme, the renatured apo-enzyme sediments as a dimer whereas the holo-enzyme sediments as a tetramer at 4° C.

It therefore can be concluded that the catalytic and structural properties of the native and renatured enzymes are very likely to be identical.

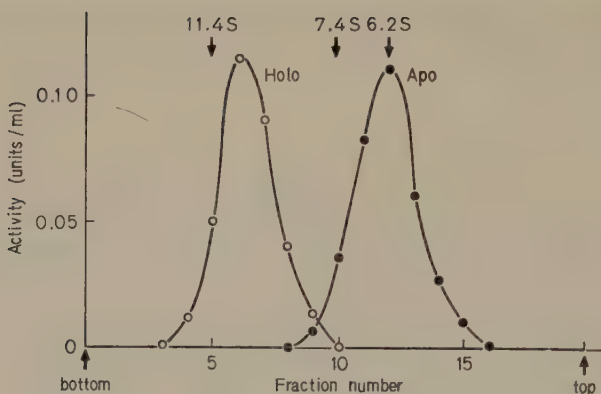


Fig. 4. *Sedimentation properties of renatured tryptophanase.* Tryptophanase was renatured at 50 $\mu\text{g/ml}$ and an aliquot was resolved into apo-enzyme as described under Methods. 150- μl samples were layered on 5—20 % sucrose gradients prepared in 0.1 M imidazole-HCl pH 8, 0.1 M KCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM EDTA and 50 mM ammonium sulfate. Centrifugation was performed at 4° C, for 12 h at 45 000 rev./min. Assay for activity was performed, for detection of the apoenzyme, after incubation of the fractions with 0.1 mM pyridoxal phosphate for 30 min at 37° C.

Properties of the inactive protein

The concentration dependence of the yield of renaturation suggests that aggregation of monomers might occur during refolding leading to the formation of inactive enzyme molecules. If this assumptions were correct, the active renatured enzyme should have the native quaternary structure of tryptophanase, while the inactive protein obtained by renaturation at high protein concentration should have a different quaternary structure. Therefore, the sedimentation properties of the 90% inactive protein obtained by renaturation at 500 $\mu\text{g/ml}$ (see fig. 1) were studied. While sucrose gradient experiments reported above indicate that the active renatured holo-enzyme indeed sediments as native holo-tryptophanase, analytical centrifugation showed that the poorly renatured preparation consists of a highly poly-disperse and aggregated population of molecules. These observations demonstrate that the low yield of activity obtained during a renaturation process performed at high protein concentration is correlated with the existence of incorrect quaternary interactions.

It was tempting to see if inactive protein obtained by

intermediate incubation in 3 M urea resulted from the same incorrect inter-molecular interactions. For this purpose, two sets of experiments have been performed.

First, the effect of tryptophanase concentration on the "3 M trough" has been examined. Fig. 5 shows that the higher the enzyme concentration, the broader the "trough".

Second, the unfolded protein, dialysed against 3 M urea, has been examined by analytical centrifugation in the

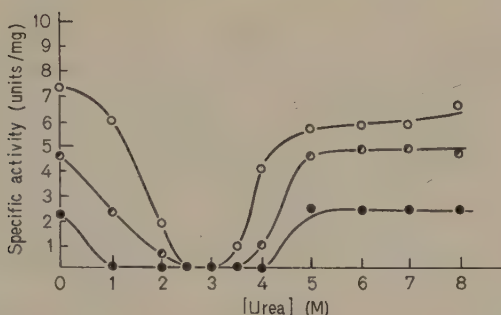


FIG. 5. Enzyme concentration dependence of the "3 M trough". The renaturation process was conducted as described in Fig. 2 at three tryptophanase concentrations: (○) 100 $\mu\text{g/ml}$, (◐) 200 $\mu\text{g/ml}$, (●) 500 $\mu\text{g/ml}$.

presence of 3 M urea: the sedimentation pattern indicated a high degree of aggregation.

These results clearly demonstrate that, in the presence of 3 M urea, the unfolded tryptophanase undergoes an inter-monomeric association which cannot be reversed by further removal of urea and leads to an inactive protein. It thus can be concluded that, for the protein obtained by intermediate incubation in 3 M urea as well as for that obtained by a one-step removal of 8 M urea, the formation of inactive protein is correlated with the presence of incorrect quaternary interactions.

An essential question to be asked about these interactions concerns their specificity: do the tryptophanase monomers aggregate through non-specific side-chain interactions, as a denatured protein does, or are these monomers interacting through specific association areas? The experimental approach to this question has been to investigate the effect of the presence of foreign proteins on the yield of the denaturation-renaturation process. The rationale was as follows: if the incorrect interactions are non-specific,

increasing concentrations of a foreign protein should also lead to incorrect interactions between this protein and tryptophanase, and therefore decrease the yield of active renatured tryptophanase.

Table 1 shows the results of an experiment performed by adding various amounts of bovine serum albumin to tryptophanase and submitting the resulting mixture to the denaturation-renaturation process. It can be seen that, except

TABLE 1. *Influence of serum albumin on the yield of tryptophanase activities after renaturation.*

The specific of the renatured enzyme is expressed in units/mg of tryptophanase. The initial specific activity of the tryptophanase preparation used was 14 units/mg.

Tryptophanase $\mu\text{g/ml}$	Specific activity at albumin concentration		
	0 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
	units/mg		
5	7.5	9	12
50	10.8	9.8	10.2
250	3.6	3.1	3.8

TABLE 2. *Influence of a crude extract on the specific activity recovered after renaturation.*

The denaturation-renaturation process was performed on 1-ml samples containing the amounts of tryptophanase (initial activity: 15 units/mg) crude extract (initial protein concentration: 10 mg/ml) and buffer required to adjust the concentrations to the values indicated in the table. The specific activities of the renatured mixtures are expressed in units/mg of tryptophanase. All renaturations were performed in the presence of 250 $\mu\text{g/ml}$ serum albumin.

Tryptophanase $\mu\text{g/ml}$	Specific activity with crude extract		
	0 mg/ml	0.2 mg/ml	2 mg/ml
	units/mg		
20	12.6	13	10.6 ^a
250	2.8	2.8	2.3 ^a

^a These values were not corrected for coprecipitation of tryptophanase and are therefore smaller than the actual values; some active enzyme could be recovered by washing the heavy protein precipitate but a quantitative determination of this activity was unfortunately not possible.

at low tryptophanase concentration where serum albumin most probably prevents surface denaturation of the enzyme, this protein does not significantly interact with tryptophanase.

It could however be argued that serum albumin refolds during the renaturation step before it can interact with the tryptophanase monomers. In order to overcome this argument, a similar experiment has been repeated using, instead of serum albumin, a crude extract obtained from *E. coli* K12 which had not been induced for tryptophanase. That all the proteins present in the extract were not refolded before tryptophanase, can be concluded from the presence of a heavy protein precipitate at the end of the treatment. As shown in table 2, no decrease in tryptophanase activity could be observed when increasing amounts of the crude extract were mixed with this enzyme during the renaturation step.

It therefore can be concluded that foreign proteins do not interfere with the refolding of tryptophanase and most probably do not interact with the tryptophanase monomers during the refolding. Thus, the interactions mentioned above, even though incorrect, must involve a specific recognition between the tryptophanase monomers.

DISCUSSION

From the results reported above, it appears that *E. coli* tryptophanase can be refolded, after denaturation in 8 M urea, in a conformation which closely resembles that of the native enzyme. Among the various parameters investigated, only the enzyme concentration seems to significantly influence the yield of the renaturation: a yield approaching 100% can be obtained only at tryptophanase concentrations below about 5 μ g/ml.

The effect of protein concentration has also been reported to play a role in the renaturation of the majority of other proteins where similar studies were conducted. In the present case high protein concentration has been shown to result in the formation of inter-monomer interactions which lead to an incorrect and polydisperse quaternary structure of the protein.

These interactions have the following properties:

a) They are formed either during an incubation at an intermediate urea concentration (3 M), during the refolding, or by performing the renaturation at high protein concentration.

b) Their formation, in both cases, is favoured at high tryptophanase concentration. This has been shown by the effect of the protein concentration on the renaturation yield and on the width of the "3 M trough".

c) They are likely to lead, in both cases, to similar molecular species. This can be inferred from three observations: the centrifugation diagrams are similar in heterogeneity and degree of aggregation; the formation of these interactions is, in both cases, protein-concentration dependent; during a one-step removal of urea the urea concentration inside the dialysis sack remains, at least for some time, close to 3 M and during this time the protein is likely to undergo the same structural transition that is observed in the "3 M trough".

d) Their formation is slow: at 5 $\mu\text{g/ml}$ of tryptophanase, the unfolded protein incubated in 3 M urea cannot be renatured by further removal of urea (fig. 5). On the contrary the unfolded protein at the same concentration, when dialysed directly against urea-free buffer, can be renatured with a high yield (fig. 1). This demonstrates that, at low protein concentration, the inter-monomeric association is too slow to occur during the time the urea concentration remains around 3 M in the course of a one-step dialysis.

e) They are incorrect since they lead to inactive molecules. Moreover, pyridoxal 5'-phosphate present during the renaturation process does not favour these interactions even though it is known to stabilize the quaternary structure of the native enzyme.

f) They are specific; this has been shown by the lack of effect of serum albumin or of a tryptophanase-free crude extract of *E. coli*, on the yield of the renaturation. The type of specificity involved in these interactions should at this point be somehow clarified. The experimental evidence reported in the present work demonstrates that the incorrect interactions can occur only between identical

polypeptide chains (*i.e.* tryptophanase monomers). It is however impossible, from these results, to decide whether these interactions always involve the same complementary parts of two polypeptide chains, or whether several such "association areas" exist on each monomer. The formation of these "association areas" and the implications on the mechanisms of folding of tryptophanase will now be discussed.

It first should be pointed out that all the results reported in this paper have also been obtained by removing the denaturing agent (*i.e.* urea) by dilution instead of dialysis. Though the yield of renaturation was significantly lower ($\approx 30\%$) experiments performed by dilution showed that the refolding process was completed within 90 min.

It has been shown that, during its refolding, tryptophanase is able to form specific incorrect quaternary interactions. This fact appears as strong experimental evidence that the folding of tryptophanase is a sequential process and that nucleation centers do exist: one must assume that the monomers are at least partially folded to account for the formation of specific interchain interactions; one also must assume that the monomers are not completely refolded to explain that incorrect, rather than the native, quaternary interactions can be formed. Fig. 6 represents a very simplified picture showing how these necessary assumptions can explain the formation of specific yet incorrect, quaternary interactions. It should be pointed out that such incorrect interchain interactions have already been reported for two monomeric enzymes: the α chain of tryptophan synthetase (13) and ribonuclease A (14). In both cases, a denaturation-renaturation process at high protein concentration was required for the preparation of artificial dimers.

Two models have been recently proposed to describe the folding of protein structures. They share one common important feature: they propose that the folding of proteins is a sequential process where "nucleation centers" are first organized and then interact specifically within one polypeptide chain to yield the proper tertiary structure. According to the first model, stretches of secondary structure would first fold and then interact within a monomer to achieve the native tertiary structure (15). The second model suggests

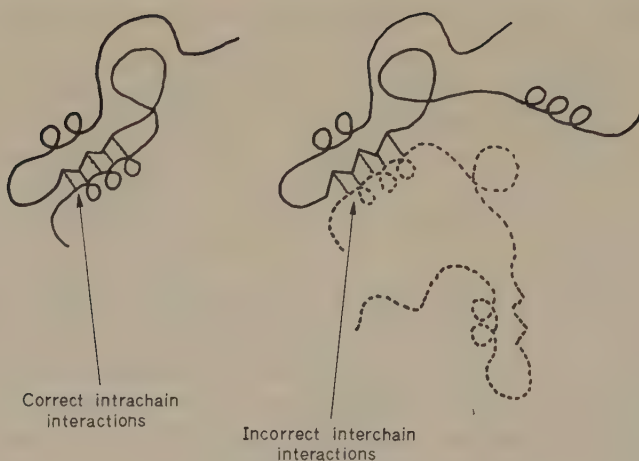


FIG. 6. *Illustration of specific incorrect quaternary interactions.* Whereas correct intra-chain interactions between complementary association areas would lead to a native structure, interactions between two chains (one in continuous, the other in interrupted lines on the drawing) prevent the folding of the proteins in their native conformation.

that independent “globules” first fold into a tertiary structure and then interact through specific interglobule association areas to yield the native conformation (16). The formation of concentration-dependent specific incorrect quaternary associations reported in this paper can easily be explained by either model, by assuming that high protein concentration allows for a kinetic competition between inter-monomeric and intra-monomeric association of stretches of secondary structures or of complementary globules.

The results reported above can be considered as evidence that the generally observed concentration dependence of protein refolding reflects the specific interactions between nucleation centers carried by different polypeptide chains.

The fact that the amount of these incorrect associations between nucleation centers strongly depends on the kinetics of their formation further supports the assessment of Wetlaufer and Ristow (17) that the conformation of a protein depends on the kinetics as well as the energetics of the folding process.

REFERENCES

1. WHITE, F.H., Jr (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1353—1360.
2. ANFINSEN, C.B. and HABER, E. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1361—1363.
3. KAGAMIYAMA, H., WADA, H., MATSUBARA, H., and SNELL, E.S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1571—1575.
4. LONDON, J. and GODBERG, M.E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1566—1570.
5. NEWTON, W.A., MORINO, Y. and SNELL, E.S. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1211—1218.
6. MORINO, Y. and SNELL, E.S. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5591—5601.
7. GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S. and DAVID, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751—766.
8. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., PARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265—275.
9. MORINO, Y., and SNELL, E.S. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2800—2809.
10. GOLDBERG, M.E. (1974) in *Dynamic Aspect of Conformation Changes in Biological Macromolecules* (C. Sadron, ed.) E. Reided Publishing Co., Dordrecht, Holland, in press.
11. CHAN, W.W.C., MORT, J.S., CHONG, D.K.K. and MACDONALD, P.D.M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2776—2784.
12. RAIBAUD, O. and GOLDBERG, M.E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3451—3455.
13. JACKSON, D.A. and YANOFSKY, C. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4526—4538.
14. CRESTFIELD, A.M., STEIN, W.H. and MOORE, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2421—2428.
15. WETLAUFER, D.B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 697—701.
16. GOLDBERG, M.E. (1969) *J. Mol. Biol.* 46, 441—446.
17. WETLAUFER, D.B. and RISTOW, S. (1973) *Annu. Rev. Biochem.* 42, 135—158.

J. London, C. Skrzynia, and M.E. Goldberg, Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur,
28, Rue du Docteur-Roux, F-75015 Paris, France

Research in the Service de Biochimie Cellulaire at the Pasteur Institute is supported by funds from the Université Paris VII, the *Centre National de la Recherche Scientifique*, the *Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique*, the *Commissariat à l'Energie Atomique*, the *Fondation pour la Recherche Médicale Française* and the National Institutes of Health (Grant no. 5 ROI AI03998-12 BIO).

Les expériences rapportées dans cet article sont à rapprocher de celles d'Anfinsen (1972) sur la Nucléase de Staphylocoque et de Tsong et *al.* (1972) sur la Ribonucléase, et constituent un faisceau d'indications permettant de décrire le repliement de la Tryptophanase en un processus séquentiel à centres de nucléation.

Si les expériences décrites ci-dessus nous ont permis d'aborder le mode de repliement *in vitro* de la Tryptophanase, elles ont cependant l'inconvénient d'avoir été effectuées par des techniques de dialyse. La détermination précise des changements de volume étant très difficile, les dialyses ne permettent pas d'avoir des résultats quantitatifs très rigoureux. De plus, cette technique ne permet aucune étude cinétique.

Nous avons donc mis au point une technique de dénaturation-renaturation par dilution en utilisant comme test de renaturation l'activité S-Méthylcystéine, beaucoup plus précis que le test d'activité Tryptophane.

EXPERIENCES DE DENATURATION-RENATURATION PAR DILUTION

A. - *Procédé expérimental*

1) Les différents tampons

— Tampon de dilution de la Tryptophanase :

Tampon KPO_4 0.1 M pH = 7,8
+ β S H 10^{-3} M

— Tampon de Dénaturation :

Tampon KPO_4 0.1 M pH = 7,8
+ urée 9 M finale
+ β S H 10^{-1} M

— Tampon de Renaturation :

Tampon KPO_4 0.1 M pH = 7,8
+ β S H 10^{-1} M
+ B S A 500 γ /ml
+ P L P 10^{-4} M

2) Dénaturation

Un échantillon concentré d'Holotryptophanase à environ 10 mg/ml, dépourvu de sulfate d'ammonium par élution sur une colonne de G 25, est dilué de 5 à 20 fois dans le tampon de dénaturation pendant 4 h, en général à température ambiante.

3) Renaturation

L'enzyme dénaturé est dilué de 50 à 200 fois dans le tampon de renaturation pendant 4 h, en général à température ambiante.

4) Mesure de l'activité enzymatique par le dosage S-Méthylcystéine

Voir : Matériel et Méthodes.

L'activité en unités/ml est toujours donnée en ml d'échantillon stock initial avant la dénaturation.

La concentration de protéine avant la dénaturation est mesurée par la méthode de Folin.

B. - Résultats expérimentaux

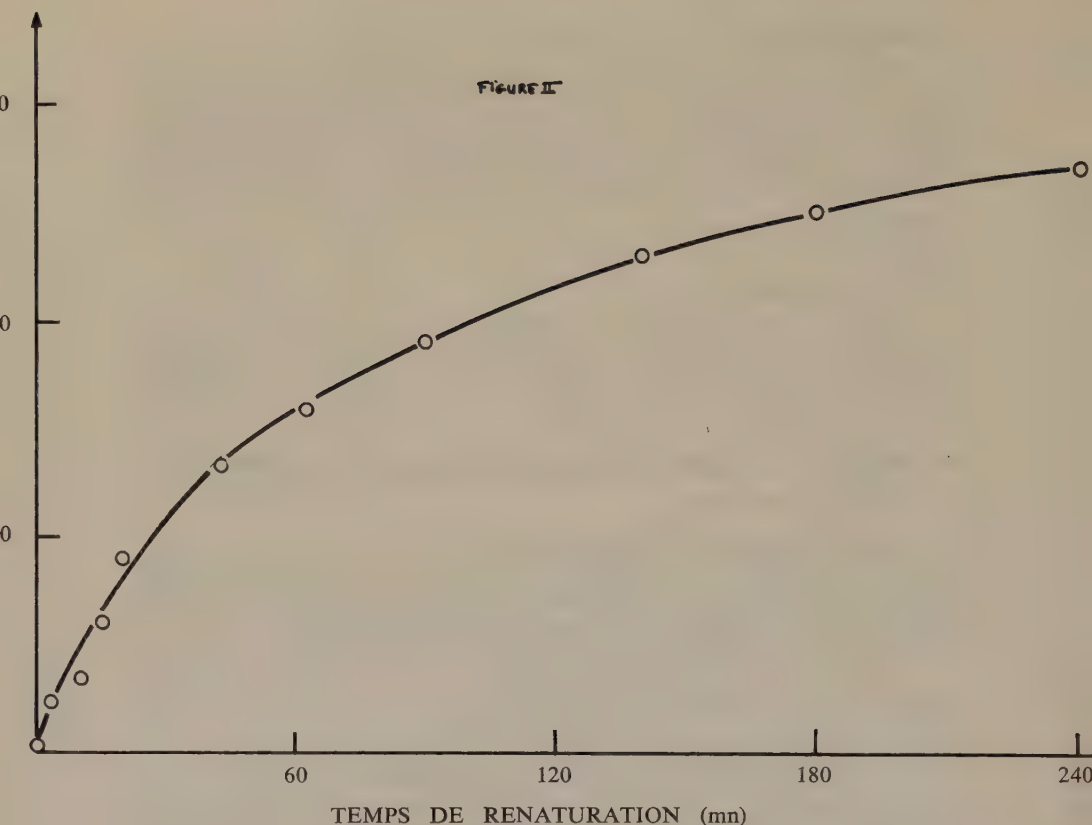
Les résultats obtenus par la technique de dialyse ont été confirmés par la technique de dilution, sauf le rendement de renaturation qui n'a pu être amélioré au-delà de 30 %, même à très faible concentration d'enzyme.

Nous avons néanmoins considéré ce chiffre comme significatif pour étudier certains paramètres qui n'avaient pas pu l'être par la technique de dialyse.

CINETIQUE DE RENATURATION

Quelle que soit la durée de la renaturation, nous avons effectué pour chaque échantillon le dosage en 60 mn après avoir vérifié qu'il est linéaire en temps, même si la durée de renaturation est inférieure à 30 mn.

La figure (II) décrit la renaturation à 25° C, d'un échantillon protéique à 3,5 γ /ml et montre que 50 % du maximum de renaturation est obtenu en 30 mn. La cinétique de renaturation présente deux constantes de temps, respectivement de 2×10^{-2} mn⁻¹ et de 8×10^{-3} mn⁻¹.



Une investigation plus systématique des cinétiques de renaturation de l'Holoenzyme et de l'Apoenzyme pourrait désormais être comparée avec les travaux sur la reconstitution de l'Apoenzyme en Holoenzyme effectués par A. Raibaud qui montrent également deux constantes de vitesse à 25°C : $9,4 \times 10^{-2} \text{ mn}^{-1}$ et $1,2 \times 10^{-2} \text{ mn}^{-1}$.

La comparaison de ces résultats ne nous permet pas, à l'heure actuelle, de conclure à l'identité de certaines étapes dans les processus de renaturation et de reconstitution, car les expériences n'ont pas été faites rigoureusement dans les mêmes conditions (en particulier quant à la concentration de PLP).

Ces résultats montrent néanmoins que la renaturation de la Tryptophanase est un processus lent, ce qui constitue un avantage certain pour l'étude du folding, et en particulier la recherche des centres de nucléation.

EFFET DU PYRIDOXAL PHOSPHATE

L'étude de la renaturation de la Tryptophanase sous forme d'Apoenzyme n'a pu être effectuée par une méthode de dosage enzymatique, car il aurait fallu au préalable reconstituer l'Apoenzyme en Holoenzyme en présence de Pyridoxal-phosphate, et ce processus était à l'époque très mal étudié.

Nous avons cependant pu examiner l'influence d'une étape transitoire de renaturation de l'enzyme sous forme d'Apoenzyme. En effet, au lieu de renaturer pendant 4 h dans le tampon de renaturation contenant du PLP, on renature tout d'abord pendant 2 h dans du tampon de renaturation sans PLP, puis 2 autres heures dans du tampon de renaturation avec du PLP. Le rendement et la cinétique de renaturation sont alors les mêmes que ceux précédemment décrits, après 4 h de renaturation en présence de PLP.

Il semble donc que, quelle que soit la structure sur laquelle se fixe le PLP, l'échantillon renaturé a les mêmes propriétés catalytiques ; en effet, lorsque la renaturation est faite en présence de PLP deux hypothèses sont possibles :

— le repliement ou folding des monomères, puis leur association en tétramères, précèdent la fixation du PLP qui n'a lieu que sur le tétramère,

— le PLP se fixe et induit le folding de chaque monomère, qui s'associent ensuite pour former le tétramère.

Par contre, lorsque la renaturation est faite en deux étapes, l'une sans PLP, l'autre avec, le PLP se fixe obligatoirement sur le tétramère.

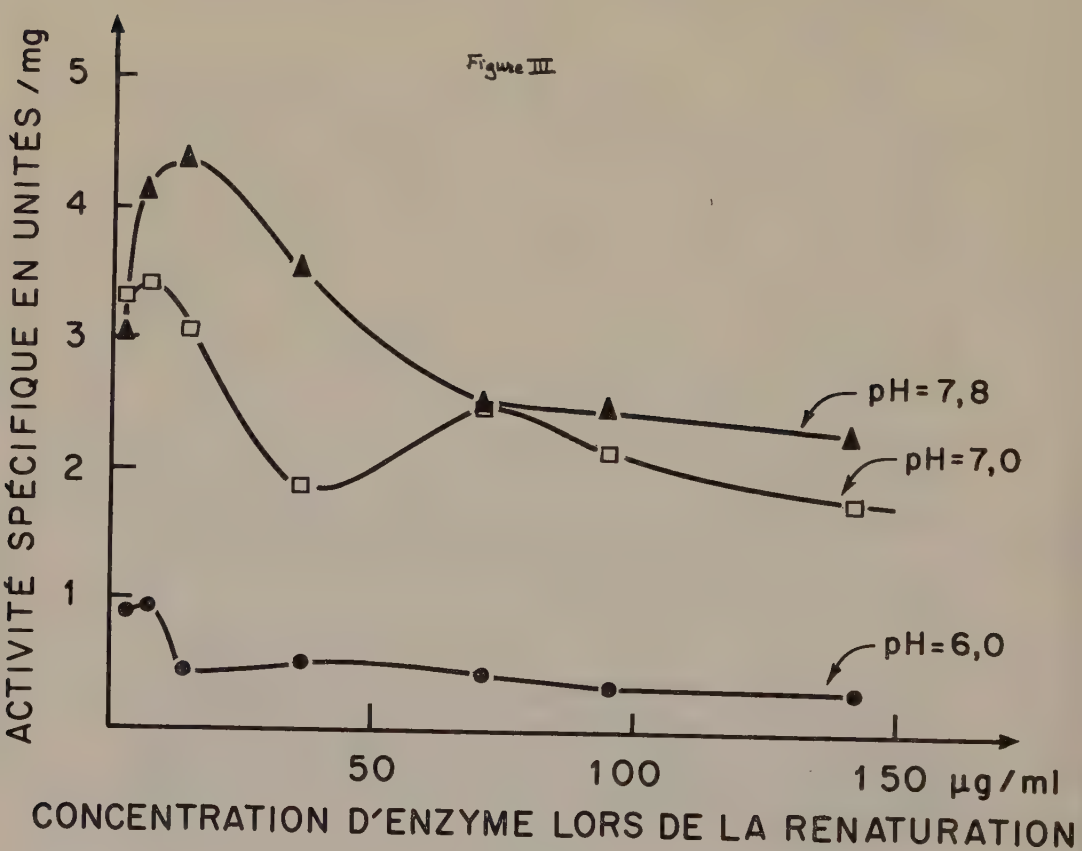
Nos résultats semblent donc confirmer l'hypothèse selon laquelle le PLP n'a pas de rôle dans le folding de l'enzyme, et que c'est ce folding qui joue un rôle cinétiquement limitant lors de la renaturation de l'enzyme vers la forme renaturée active.

EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA RENATURATION

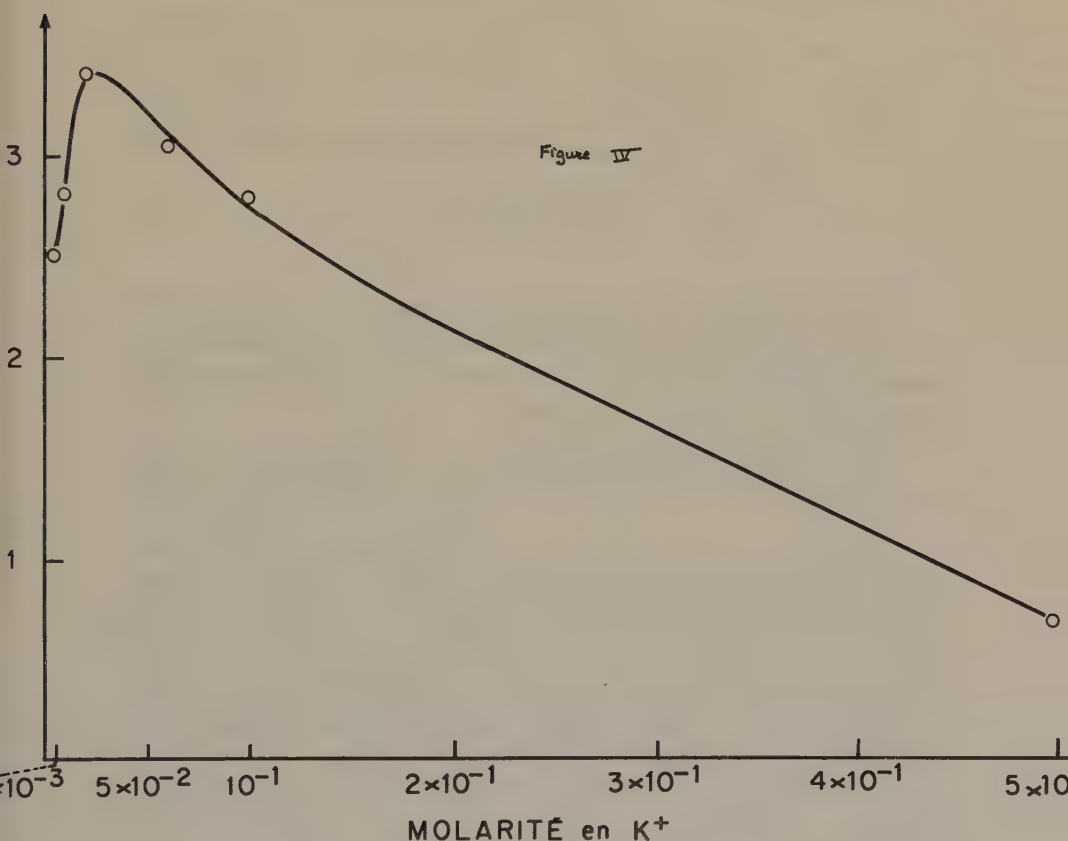
Les rendements sont les mêmes à 28° C et à 20° C. Par contre, il n'y a pas de renaturation à 4° C, même lorsque celle-ci a été initiée à 28° C.

EFFET DU pH ET DE LA FORCE IONIQUE

La figure III montre qu'au voisinage du point iso-électrique ($\text{pH} = 5,8$) les propriétés de renaturation de la Tryptophanase sont altérées.



La figure IV montre l'influence de la force ionique en présence d'ions K^+ . Cette courbe faite un peu tard au cours de ce travail, indique que nous n'avons pas utilisé la force ionique optima dans les expériences de dénaturation-renaturation.



INFLUENCE DES IONS POTASSIUM

Le tableau ci-dessous montre que les ions K^+ , absolument nécessaires à l'activité catalytique, ne sont pas indispensable lors du processus de folding, mais qu'ils le favorisent.

Le rôle des ions K^+ lors de la renaturation de la Tryptophanase est à rapprocher du rôle qu'ils ont dans le maintien de la structure et dans l'activité catalytique de l'Holoenzyme.

Milieu de Renaturation	% de Renaturation
Tampon KPO_4 0.1 M pH = 7,8	30 %
Tampon Imidazole HCl 0.1 M pH = 7,8	15 %
Tampon Imidazole HCl 2×10^{-2} M pH = 7,8 + KCl 10^{-1} M	28 %

C. - Conclusion

Ces expériences n'ont pas été poursuivies d'une part à cause du faible rendement de renaturation, et d'autre part parce qu'elles s'éloignaient du but initial de ce travail sur la Tryptophanase.

Elles constituent néanmoins des préliminaires intéressants pour l'étude du folding *in vitro* de cet enzyme.

En effet, grâce au travail de A. Raibaud sur la reconstitution de l'Apoenzyme en Holoenzyme, la comparaison des cinétiques de folding de ces deux formes, après dénaturation en urée, est devenue possible et une confirmation définitive de l'absence de rôle du coenzyme sur la renaturation pourrait être envisagée. De plus, la technique de dilution peut permettre d'étudier la cinétique d'apparition du trou « 3 M urée » que nous avons mis en évidence par dialyse, et que nous avons attribué à des interactions quaternaires spécifiques entre chaînes polypeptidiques de Tryptophanase.

Ce travail, s'il était poursuivi dans ces directions, pourrait alors constituer un ensemble permettant de confirmer le rôle du processus de nucléation dans l'initiation du folding des macromolécules oligomériques (Wetlaufer, D.B., 1973) et de donner des arguments en faveur d'un mécanisme de folding à plusieurs étapes comme cela a déjà été montré dans le cas de la ribonucléase pancréatique de bœuf (Scott, A.A., 1963) et dans le cas de la trypsine et de son zymogène (Pohl, F.N., 1968).

CHAPITRE IV

COUPLAGE ENTRE STRUCTURE TERTIAIRE ET STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA TRYPTOPHANASE

L'existence de plusieurs sous-unités identiques au sein d'un enzyme pose la question fondamentale de savoir pourquoi l'entité catalytique n'est pas la sous-unité isolée comme le montrent de nombreux exemples (glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase de muscle de lapin, lactate déshydrogénase de muscle de lapin).

Pour expliquer ce fait expérimental, il a été postulé l'existence, entre protomères, d'interactions quaternaires indispensables à l'activité catalytique. Même si, comme dans le cas de la Tryptophanase, on peut mettre en évidence les effets de ces interactions sur la structure quaternaire d'un enzyme, on ne connaît pas leur rôle exact et en particulier, celui qu'elles peuvent avoir sur la structure tertiaire de chaque protomère.

C'est pour étudier ce couplage entre structure tertiaire et structure quaternaire de la Tryptophanase que nous avons cherché à obtenir et à caractériser des molécules dites « hybrides », c'est-à-dire des tétramères dont certains protomères seulement sont modifiés chimiquement.

La littérature fournit certains exemples d'hybridations d'oligomères utilisées essentiellement pour déterminer la stoechiométrie des sous-unités.

Ainsi l'aldolase qui, succinylée et dissociée en urée 4 M puis réassociée, a des propriétés électrophorétiques compatibles avec un enzyme à 4 chaînes polypeptidiques (Meighen

E.A., 1969). Ces travaux sur l'aldolase ainsi que ceux sur la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (Hoagland, V.D. Jr., 1969) ont montré que l'activité de ces molécules hybrides est exactement proportionnelle au nombre de sous-unités non modifiées dans la protéine hybride.

Un exemple plus intéressant, à cause de la spécificité de la modification, est celui de la sous-unité β_2 de la Tryptophane synthétase. C'est un enzyme à PLP qui, par ailleurs, dégrade aussi le Tryptophane comme la Tryptophanase, mais avec des constantes catalytiques très mauvaises. Hathaway (1969) a obtenu des molécules hybrides en réduisant au borohydrure de sodium le PLP lié à certains protomères de l'enzyme. Il constate que l'activité catalytique est la moitié de celle de l'enzyme natif, démontrant ainsi l'absence de couplage fonctionnel entre protomères.

Cet exemple nous suggéra une approche technologique pour aborder le problème du couplage entre structure tertiaire et quaternaire de la Tryptophanase.

En effet, Morino et Snell avaient déjà donné des indications en ce sens lorsqu'ils constatèrent que l'Apodimère se réassociait en Holotétramère en présence de PLP à 4° C de façon coopérative.

La publication ci-jointe décrit le mode d'obtention et les propriétés physico-chimiques de molécules hybrides de Tryptophanase.

THE TRYPTOPHANASE FROM ESCHERICHIA COLI K 12

III. FURTHER CHARACTERIZATION OF HYBRIDS BETWEEN THE APO- AND HOLOENZYME *

Cécile SKRZY尼亚, Jacqueline LONDON,
and Michel E. GOLDBERG ⁽¹⁾

*From the Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur
75015 Paris, France*

SUMMARY

A chemically modified protein, reduced holotryptophanase, was obtained by reduction of the Schiff base between the protein and its coenzyme, pyridoxal 5'-phosphate. The renaturation from 8 M urea of mixtures originally containing the native and the modified enzymes is described. It is shown that during this process hybrid molecules are formed and that, after resolution of the unmodified coenzyme sites, the hybrid molecules remain tetrameric at low temperatures whereas the apoenzyme dissociates into dimers. This observation strongly supports previous results concerning the existence of a tight coupling between the tertiary structures of the protomers within tryptophanase.

* This work was carried out in the Service de Biochimie Cellulaire of the Institut Pasteur and was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, the Université Paris VII, the Commissariat à l'Energie Atomique, the Fondation pour la Recherche Médicale Française, and the National Institutes of Health.

(1) J. Biol. Chem., vol. 249, n° 7, p. 2325 (1974).

The tryptophanase from *Escherichia coli* has been shown to contain four identical polypeptide chains (1, 2) each binding 1 molecule of pyridoxal 5'-phosphate (3). This cofactor can be removed from the protein and the inactive apoenzyme thus obtained has been shown to dissociate into dimers at low temperatures. This dissociation can be reversed either by raising the temperature or, at low temperatures, by addition of the coenzyme in substoechiometric amounts (3). The latter observation was the first indication that hybrid molecules, in which some protomers are saturated with pyridoxal-P (holoprotomers) and others are free of cofactor (apoprotomers), exhibit the same hydrodynamic properties as the fully saturated holoenzyme molecules. However, the possibility that the coenzyme might be in association-dissociation equilibrium with the protein did not allow a precise characterization of such hybrids. It therefore appeared of interest to prepare and characterize stable hybrids in which the cofactor would be irreversibly bound to a limited number of binding sites within a tetramer. A first set of observations has been reported showing that most of the apoprotomers within such stable hybrids are as heat-stable as holoprotomers (4).

The purpose of this communication is to report data which show that these hybrids also have the cold stability properties characteristic of the fully saturated holoenzyme. These data were obtained by preparing hybrids from mixtures of native and reduced enzymes and studying their sedimentation properties at low temperatures.

Holotryptophanase was purified by the method described earlier (2) and reduced holotryptophanase was obtained by reduction with sodium borohydride (5). Mixtures containing various weight ratios of holo- and reduced holotryptophanase were submitted to the denaturation-renaturation process described elsewhere¹. The yield of activity recovered after such a process is shown in table I. It can be concluded that, under the conditions described in the legend to table I, the renaturation of the unreduced protomers is not affected by the presence of the reduced protomers. Two hypotheses can account for this result:

¹ J. London, C. Skrzynia, and M.E. Goldberg, manuscript in preparation.

(a) no hybrids have been formed in the course of this treatment; or, (b) hybrids have been formed and the activity of a holoenzyme within a hybrid is not affected by the state of reduction of the neighboring protomers.

TABLE I

Mixtures of apo- and reduced holoenzyme were prepared in 0.1 M potassium phosphate, pH 7.8, 0.1 M β -mercaptoethanol, 2 mM EDTA, and 500 μ g per ml of bovine serum albumin, then dialyzed overnight at 4° against 8 M urea in the same buffer, and finally dialyzed at room temperature against the urea-free buffer containing 0.1 mM pyridoxal phosphate. The specific activity of the initial preparation was 12.8 units per mg.

Apoenzyme concentration	Reduced holoenzyme concentration	Activity after urea treatment	Specific activity after urea treatment	Yield of activity after urea treatment
μ g/ml	μ g/ml	unit/ml	unit/mg	%
2	8	0.018	9	70
5	5	0.042	8	62
8	2	0.066	8	62
10	0	0.096	9	70

The choice between these two hypotheses was made possible by studying the sedimentation properties at low temperatures of the "renatured" mixture. It has been shown elsewhere that renatured apotryptophanase sediments at 4° as a dimer whereas the renatured holoenzyme sediments as a tetramer¹. It therefore could be predicted that, if no hybrids have been formed, centrifugation of the renatured mixture free from nonreduced pyridoxal-P should indicate that all the apoprotomers migrate as dimers. If, on the contrary, hybrid molecules have been formed and if the apo-hybrids are as cold-insensitive as the holoenzyme, the apoprotomers within the hybrids should sediment as tetramers.

A stoichiometric mixture of native and reduced tryptophanase has therefore been submitted to the denaturation-renaturation process described in table I, freed from unreduced coenzyme by treatment with penicillamine (3), and submitted to centrifugation on a sucrose gradient at 4°.

Since reduced holoprotomers are irreversibly inactivated, the apoprotomers could be unambiguously detected by assay of the enzymatic activity after addition of pyridoxal-P to the fractions.

It can be seen (fig. 1) that practically all of the activity, and therefore all of the apoprotomers, appeared in a single symmetrical peak corresponding to the tetramer.

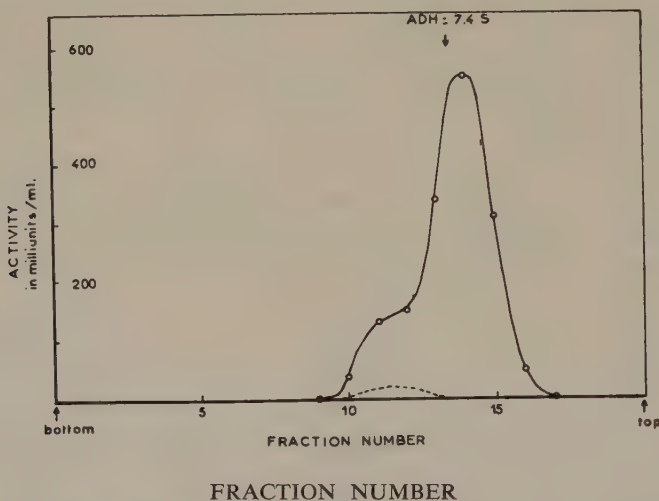


FIG. 1. Sedimentation of the hybrids. Sedimentation was performed as indicated in the legend to table 00. The "renatured mixture" (150 μ l) containing 7 μ g per ml of apoenzyme and 7 μ g per ml of reduced holoenzyme was layered on the gradient. The yield of activity after sedimentation was 40%. The arrows indicate the sedimentation of apoenzyme, holoenzyme, and alcohol dehydrogenase (ADH).

In a control experiment, a mixture of apo- and reduced holoenzyme (which had not been treated with urea) was sedimented under identical conditions. The fact that practically all the apoprotomers sedimented in a position corresponding to the dimer (fig. 2) rules out the possibility that a significant subunit exchange between apo- and reduced holoenzyme might be responsible for the pattern observed in fig. 1.

These observations clearly indicate that hybrids have been formed during the denaturation-renaturation process and that these hybrids are cold-insensitive.

It should however be pointed out that the results reported above should not be considered as quantitative for the two following reasons. First, it is likely that the

population obtained by the urea treatment is heterogeneous and consists of tetramers containing from 0 to 4 irreversibly bound coenzyme molecules. Second, the activity detected after the sucrose gradient centrifugation does not reveal all the apoprotomers present in the original mixture: since

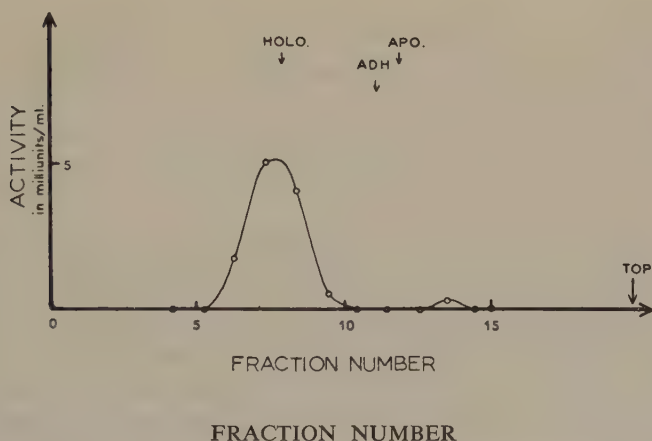


FIG. 2. ○—○, sedimentation of a mixture of apo- and reduced holoenzyme. The untreated mixture (150 μ l) containing 600 μ g per ml of apoenzyme and 700 μ g per ml of reduced holoenzyme was layered on the gradient. ---, residual activity of the reduced holoenzyme alone. The conditions were the same as described in legend to table II. Comparatively high concentration of proteins were used to enhance the absolute amount of subunit exchange which might occur. *ADH*, alcohol dehydrogenase.

the renaturation process has to be conducted at very low protein concentrations¹ and since the apoenzyme is fairly unstable during centrifugation at such concentrations (see table II), the final yield of approximately 50% of the initial enzymatic activity could not be improved.

TABLE II

Sedimentation was performed on a 5 to 20% sucrose gradient in 0.02 M imidazole-HCl, pH 8, 0.1 M KCl, 2 mM EDTA, 50 mM ammonium sulfate, and 5 mM mercaptoethanol, using either a Beckman L-2-65B or an M.S.E. Superspeed 65 centrifuge with the corresponding swing-out rotor (3 $\times$ 5 ml). Temperature was 4°. Centrifugation

gation speed was 45,000 rpm, for 12 hours. Assay was performed after addition of pyridoxal-P to each fraction.

Enzyme form	Sample concentration	Yield of activity after
	<i>mg/ml</i>	<i>%</i>
Apoenzyme	0.60	75
Apoenzyme	0.10	40
Apoenzyme	0.01	20
Holoenzyme	0.01	75

Nevertheless, the above results unambiguously demonstrate that at least some classes of hybrids exist and are not dissociated at low temperatures. It can therefore be concluded that the binding of a specific ligand, pyridoxal-P, to a limited number of protomers within the tetrameric tryptophanase gives this protein the heat stability (4) and cold insensitivity of the fully saturated holoenzyme. The fact that these two quite different physical properties of an apoprotomer are so dramatically modified within hybrids strongly supports the argument developed earlier (4) which proposes that the change in the structure of a protomer brought about by its binding to pyridoxal-P is transmitted, via the quaternary interactions, to the other protomers.

REFERENCES

1. KAGAMIYAMA, H., WADA, H., MATSUBARA, H., and SNELL, E.E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5591-5601.
2. LONDON, Y., and GOLDBERG, M.E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1566-1570.
3. MORINO, Y., and SNELL, E.E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5591-5601.
4. RAIBAUD, O., and GOLDBERG, M.E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3451-3455.
5. MORINO, Y., and SNELL, E.E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2800-2809.

DISCUSSION

Les études sur des enzymes allostériques ont montré que la fixation de certains ligands induisent des modifications de propriétés catalytiques. Ces modifications sont attribuées, dans le modèle de l'allostérie, à un déplacement — par le ligand — de l'équilibre des formes R et T et, dans le modèle séquentiel de Koshland, à une variation — lors de la fixation des premières molécules de substrat — de la constante d'affinité des protomères non encore saturés.

Nous avons montré que des molécules hybrides de Tryptophanase, obtenues par modification chimique spécifique de certains protomères existent et qu'elles ont les propriétés de cryostabilité (manuscrit ci-dessus) et de thermosensibilité (O. Raibaud, 1973) de l'Holoenzyme.

L'irréversibilité (par réduction au borohydrure de sodium) de la fixation du coenzyme permet de figer la fonction de saturation et de s'affranchir ainsi pour l'étude de la structure des molécules hybrides, des équilibres d'association-dissociation entre le ligand et la protéine. En particulier, le fait d'avoir figé ces équilibres nous a permis d'étudier non plus une population en équilibre de saturation, comme c'est le cas pour les enzymes allostériques, mais une population, hétérogène certes, mais saturée irréversiblement par 0, 1, 2, 3 ou 4 molécules de cofacteur.

L'existence et les propriétés de ces molécules hybrides démontrent d'une part l'influence de l'interaction d'une molécule de ligand avec un apoprotomère sur la stabilité des interactions quaternaires (cryostabilité des hybrides). D'autre part, l'interaction ligand-protomère jouant *a priori* au niveau tertiaire, nous avons ainsi mis en évidence l'influence de la structure tertiaire sur la stabilité des interactions quaternaires.

Les propriétés de stabilité thermique des hybrides

montrent également l'influence des interactions quaternaires sur la stabilité de la structure tertiaire des apo-protomères (O. Raibaud, 1973).

Cette étude a donc permis de mettre en évidence l'existence d'un couplage énergétique entre structure tertiaire et structure quaternaire de la Tryptophanase.

Ce n'est que l'isolement et la caractérisation structurale des différentes espèces moléculaires hybrides obtenues qui nous permettront de savoir si ce couplage énergétique est accompagné d'un couplage structural.

S'il en était ainsi, nous aurions une preuve du rôle de la structure quaternaire d'un oligomère à moduler le repliement initial de ses protomères.

CHAPITRE V

PROPRIÉTÉS DE LA BIOSYNTHÈSE DE LA TRYPTOPHANASE EN MILIEU RICHE

La mise au point des conditions physiologiques permettant d'obtenir des cultures d'*E. coli* K12 produisant de la Tryptophanase à haute activité spécifique nous a conduit à corréler les problèmes que posent cette biosynthèse en milieu riche avec les travaux de physico-chimie que nous avons effectués sur cet enzyme.

En effet, si le but de notre travail de physico-chimie était d'approcher les problèmes que pose le repliement de la structure d'un oligomère, les technologies que nous avons utilisées montraient que le repliement de la Tryptophanase se produisait *in vitro* en 30 à 100 minutes.

Or, lors de la biosynthèse d'une macromolécule biologique, l'obtention d'une structure quaternaire active se fait en quelques minutes, voire en quelques secondes.

Les études faites sur les protéines oligomériques indiquent qu'il y a synthèse préférentielle sur les ribosomes de certaines chaînes spécifiques intervenant dans le folding terminal de la macromolécule. Ainsi, dans le cas de l'hémoglobine, les chaînes de globine forment des $\alpha\beta$ dimères qui après s'être combinés à l'hème donnent des $\alpha_2\beta_2$ tétramères.

Dans le cas de la Tryptophanase dont les quatre chaînes polypeptidiques sont identiques, on ne sait pas si le tétramère synthétisé est de l'Apoenzyme auquel se fixe le PLP ou si l'enzyme est directement synthétisé sous forme d'Holoenzyme.

Les travaux de Snell *et coll.* (1964) avaient déjà mis

l'accent sur la difficulté à obtenir des conditions de culture conduisant à la production par *E. coli* B de Tryptophanase à haute activité spécifique.

Nous avons, de notre côté, recherché les conditions de culture de *E. coli* K12 optimales pour la synthèse de Tryptophanase.

Au cours de cette étude, l'existence d'une longue phase de latence entre l'induction par le Tryptophane et l'apparition de l'activité Tryptophanase a posé diverses questions.

Nous avons cherché à y répondre soit en termes de folding *in vivo*, soit en termes de régulation de la biosynthèse de cet enzyme.

PROPRIETES DE LA BIOSYNTHESE DE LA TRYPTOPHANASE D'E. COLI EN MILIEU RICHE

I. - EXISTENCE D'UN COMPOSE INDISPENSABLE A LA BIOSYNTHESE DE L'ENZYME

par

J. LONDON et M. E. GOLDBERG

Projet pour une publication

INTRODUCTION

La Tryptophanase d'*E. coli* est un enzyme dont la fonction principale est de dégrader le tryptophane, acide aminé essentiel pour la synthèse des macromolécules biologiques. Elle catalyse en outre d'autres réactions soit de déshydratation, soit d' $\alpha\beta$ élimination, soit de β remplacements avec des substrats comme la sérine, la S-méthylcystéine et la cystéine. La présence d'un coenzyme, le Pyridoxal-phosphate est nécessaire pour toutes ces réactions.

La biosynthèse de cet enzyme est inductible par le tryptophane (1) et est sensible à la présence d'hydrates de carbone fermentables et en particulier le glucose (2).

La Tryptophanase a fait l'objet de nombreuses études quant à sa sensibilité à la répression catabolique par le glucose (3), mais aucun des auteurs n'a pu rendre compte de façon satisfaisante des différences observées par rapport à la β -galactosidase (4) et (5).

D'autre part, dès 1964, Beggs et Lichstein (3) obser-

vaient qu'en milieu minimum additionné de casamino acides, la biosynthèse de la Tryptophanase était réprimée pendant plusieurs générations au début de la croissance bactérienne.

Enfin, les travaux qui ont conduit Morino et Snell (6) à purifier et à étudier les propriétés physico-chimiques de la Tryptophanase d'*E. coli* B ont montré que les conditions physiologiques d'obtention de cet enzyme à haute activité spécifique, à partir d'une souche dite constitutive, dépendait de nombreux facteurs dont la nature du milieu, le nombre de doublements effectués à partir du début de l'induction par de fortes concentrations de Tryptophane et d'Indole.

Nous avons préféré, pour notre part, travailler sur *E. coli* K12, car la génétique de cet organisme est bien connue.

De plus, on connaît la localisation sur le chromosome bactérien d'*E. coli* K12, des gènes de structure et de régulation de la Tryptophanase. Ils sont situés entre *AroI* et *Ilv* (7).

CHOIX DE LA SOUCHE BACTERIENNE

A partir de la souche d'*E. coli* K12 sauvage Hfr 3000 auxotrophe pour la vitamine B₁, nous avons d'abord essayé d'obtenir des souches soit constitutives, soit superinductibles.

Nous avons pour cela utilisé deux méthodes :

— la première, basée sur l'utilisation du tryptophane comme source d'azote et de carbone, ou de carbone en présence de sulfate d'ammonium limitant.

— la deuxième, basée sur la propriété découverte par M. Riley (8) que des mutants constitutifs pour la Tryptophanase se multiplient préférentiellement à 30° C au lieu de 37° C.

Par aucune de ces deux méthodes nous n'avons pu obtenir de mutants constitutifs stables. Il semble d'ailleurs que les mutants dits constitutifs pour la Tryptophanase,

tant de *E. coli* K12 (M. Riley, 7 et 8) que de *E. coli* B (Newton, W.A. ; 9) soient très fortement superinductibles.

Le fait que, les mutants constitutifs soient si difficiles à obtenir, les activités spécifiques rapportées dans la littérature si peu reproductibles, les conditions de culture utilisées par Snell si complexes, nous ont conduit à étudier systématiquement la biosynthèse de la Tryptophanase par la souche sauvage Hfr 3000 d'*E. coli* K12.

MATERIEL ET METHODES

1) Souches bactériennes et Milieux de culture

L'enzyme est extrait de la souche Hfr 3000 d'*Escherichia coli* K12, auxotrophe pour la vitamine B₁. Cette souche est conservée à 4° C en tubes de gélose inclinée.

— La souche B₁T₇A, fournie par E. Snell, est un mutant spontané constitutif pour la Tryptophanase et dépourvu de tous les enzymes de la chaîne de biosynthèse du tryptophane à partir de l'acide anthranilique.

— La souche 11487 - AB2151 est un mutant Hfr de K12 ne synthétisant pas la Tryptophanase, dont les autres caractéristiques sont :

Isoleu Val, Leu, thiamine, LacZ, strepto-résistante.

Les milieux de culture sont de trois types :

— *Milieu minimal synthétique n° 63*

contenant :

— H ₂ KPO ₄	13,6	g
— MgSO ₄ + 7 H ₂ O	0,2	g
— SO ₄ (NH ₄) ₂	2	g
— FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,005	g
— H ₂ O distillée q s p	1 litre	

ajusté à pH = 7,2 avec KOH.

La vitamine B₁ a été ajoutée à une concentration de 0,0002 %.

Les sources de carbone variables étaient à une concentration de 0,4 %, sauf indication spéciale figurant dans le texte.

— *Milieu riche LENNOX, ou bouillon (ML)*

— Extrait de levure	5,0 g
— Bactotryptone	10,0 g
— NaCl	5,0 g
— H ₂ O q s p	1 litre

ajusté à pH = 7,4 avec KOH.

— *Milieu riche : Casamino acides (C.A.)*

- Milieu minimum + Casamino acides
(ou hydrolysate acide de Caséine).

On ajoute au milieu 63 B₁ + glycérol à 0,4 % des Casamino acides à concentration variable, de 0,05 % à 2 %.

— *Milieu riche SNELL*

— KH ₂ PO ₄	7,5 g/l
— K ₂ HPO ₄	16,7 g/l
— (NH ₄) ₂ SO ₄	1,6 g/l
— Extrait de levure	0,1 g/l
— Tryptophane	0,33 g/l
— Indole	0,25 g/l
— Caséine (hydrolysé enzymatiquement)	20,0 g/l

- Mélange minéral (une petite quantité d'H₂SO₄ 10 ml doit être ajoutée pour faciliter la dissolution des minéraux) :

— MnSO ₄ .H ₂ O	0,1 g/l
— CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3 g/l
— FeSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/l
— MgSO ₄ .7H ₂ O	30,0 g/l
— ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g/l
— CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 g/l
— NaCl	25,0 g/l

Cultures bactériennes

Sauf indication contraire, les cultures sont effectuées en aérobiose à 37° C sous agitation, soit en tube à essai de 5 ml, soit en erlenmeyers stériles de 100 à 500 ml. Quel que soit le volume de culture, celle-ci est toujoursensemencée

avec une culture overnight, le plus souvent en milieu minimum et en proportion de 0,2 % (v/v).

2) Techniques d'Extraction de l'Activité Enzymatique

Pour les mesures de taux différentiels de synthèse, on travaille soit sur extraits bactériens, soit sur des échantillons bactériens toluénisés (suspensions bactériennes).

— *Suspensions bactériennes*

Des échantillons bactériens de 2 ml sont toluénisés en présence de 25 μ l de toluène et de 25 μ l de déoxycholate, sous agitation vigoureuse à 37° C, pendant 30 mn.

La concentration protéique est déterminée avant toluénisation par la mesure de la densité optique de la culture à 600 nm ; mesure effectuée avec un Spectrophotomètre Zeiss. Nous avons utilisé comme facteur de corrélation :

$$1 \text{ D.O.}_{600\text{nm}} = 0,2 \text{ mg/ml de protéines}$$

— *Extraits bruts*

L'échantillon bactérien est lavé deux fois avec du tampon KPO_4 0.1 M, pH 7,8, puis resuspendu dans ce tampon.

Les protéines sont alors extraites par vibrations soniques à haute fréquence dans un oscillateur Mullard, pendant 8 fois 10 sec à 4° C.

Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation dans une centrifugeuse Sorvall SS4 à 15 000 rpm pendant 30 mn à 4° C. Les extraits centrifugés sont dosés immédiatement.

Le dosage de la concentration protéique est effectué par la méthode de Folin ou de Biuret.

3) Mesure de l'activité enzymatique

Elle consiste à mesurer l'Indole formé à partir de Tryptophane par catalyse enzymatique.

Le milieu de dosage est constitué de :

- Tampon KPO_4 0.1 M - pH 7,8
- B S A 250 γ /ml
- PLP 10^{-4} M
- β SH 10^{-4} M

Dans des erlenmeyers de 50 ml, contenant 0,4 ml du tampon de dosage, on ajoute 100 μ l de solution enzymatique et 2 ml de Toluène ; on incube à 37° C.

On démarre la réaction enzymatique par addition de 100 μ l de Tryptophane à 10 mg/ml.

La réaction se poursuit sous agitation vigoureuse à 37° C, dans un bain « Brunswick ». L'indole inhibiteur formé au cours de la réaction enzymatique est ainsi piégé dans la phase Toluène, et est révélé, après la durée de dosage désiré, par 3,5 ml de réactif d'Erlich fraîchement préparé (5 volumes de 5 % p. diméthylamino-benzaldéhyde dans de l'éthanol à 95 %, additionné de 12 volumes d'acide sulfurique 5 % dans le n-butanol).

On laisse la coloration se développer pendant 25 mn, et on lit la densité optique à 570 nm.

Lorsque les mesures sont effectuées sur des suspensions bactériennes, il faut tenir compte, lors des déterminations d'activité enzymatique, de la quantité d'Indole présente dans la suspension elle-même.

L'activité est exprimée en μ Mole d'Indole libéré par mn et par ml de solution enzymatique.

4) Mesures de l'accumulation de Tryptophane

Ces mesures ont été faites pour des cultures en Milieu minimum additionné ou non de Casamino acides.

Les cultures prélevées à une certaine Densité optique sont centrifugées et resuspendues dans du milieu de culture frais additionné de chloramphenicol. Au temps 0, on ajoute 200 γ de Tryptophane radioactif marqué au ^{14}C , à une concentration de 2 mg/ml et une radioactivité spécifique de 1 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

Les comptages sont effectués dans un compteur à scintillation liquide Packard Tri Car B, type 574.

5) Expériences de transfert

Elles consistent à séparer, à la température ambiante, les bactéries et le milieu de culture ayant atteint la capacité de synthétiser la Tryptophanase.

Pour les transferts, deux méthodes peuvent être utilisées :

— soit on resuspend les bactéries capables de synthétiser la Tryptophanase (« épuisées ») dans du milieu de culture n'ayant pas déjà servi à synthétiser de la Tryptophanase (milieu frais), après les avoir ou non lavées avec du tampon KPO_4 0.1 M, $\text{pH} = 7,8$;

— soit on ensemence le milieu de culture ayant déjà servi à synthétiser la Tryptophanase (milieu « épuisé ») avec des bactéries fraîches.

On vérifie au préalable que dans ces deux types d'expérience, le milieu dans lequel va être étudié la synthèse de la Tryptophanase ne contient plus de bactéries (densité optique à 600 nm inférieure à 0,020).

RESULTATS

I. - INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE SUR LA BIOSYNTHESE DE LA TRYPTOPHANASE

Compte tenu des difficultés rencontrées par Snell *et coll.* (9 et 10) à obtenir des conditions de culture conduisant à la synthèse de Tryptophanase à haute activité spécifique, nous avons entrepris une étude systématique du taux différentiel de synthèse (J. Monod, 11) de cet enzyme dans divers milieux de culture.

A) Biosynthèse en milieu minimum

Les figures I et II montrent qu'en milieu minimum additionné de glycérol ou de glucose comme source de carbone, le taux différentiel de synthèse est constant.

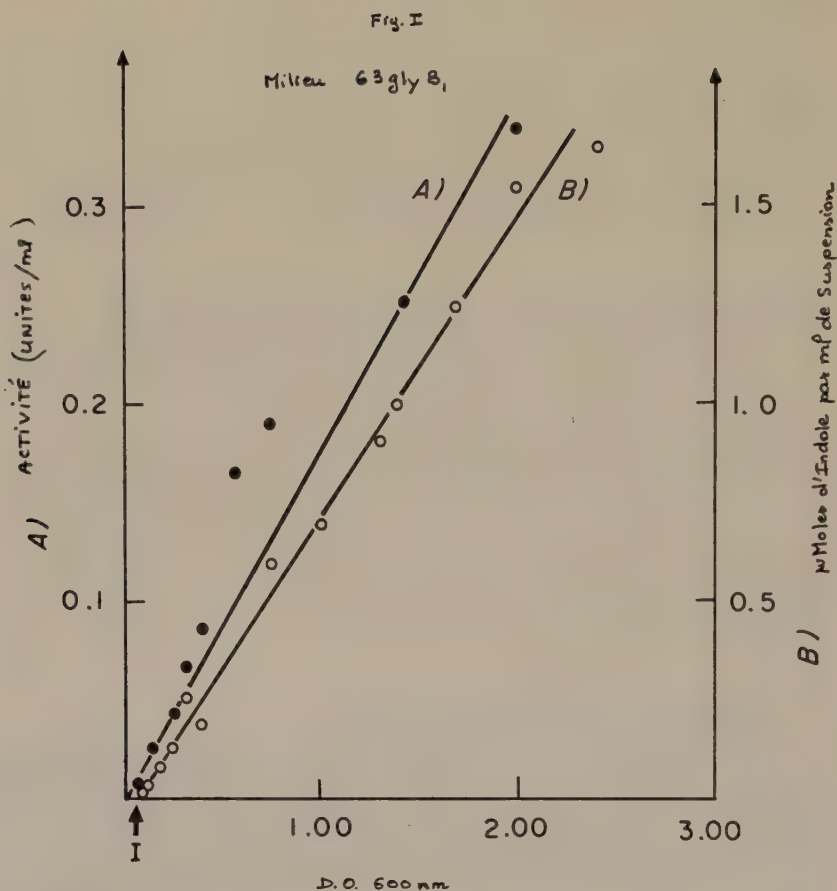
La comparaison de ces deux figures ainsi que le tableau I confirment la sensibilité de la Biosynthèse de la Tryptophanase à la répression catabolique par le glucose (2).

TABLEAU I

BIOSYNTHESE DE LA TRYPTOPHANASE EN MILIEU MINIMUM

Cultures à 37° C pendant 10 h

Source de carbone 0,4 %	Activité TPase en unités/mg
Glycérol	0,6
Glucose	0,2 - 0,07
Lactate	0,8



B) Biosynthèse en milieu riche

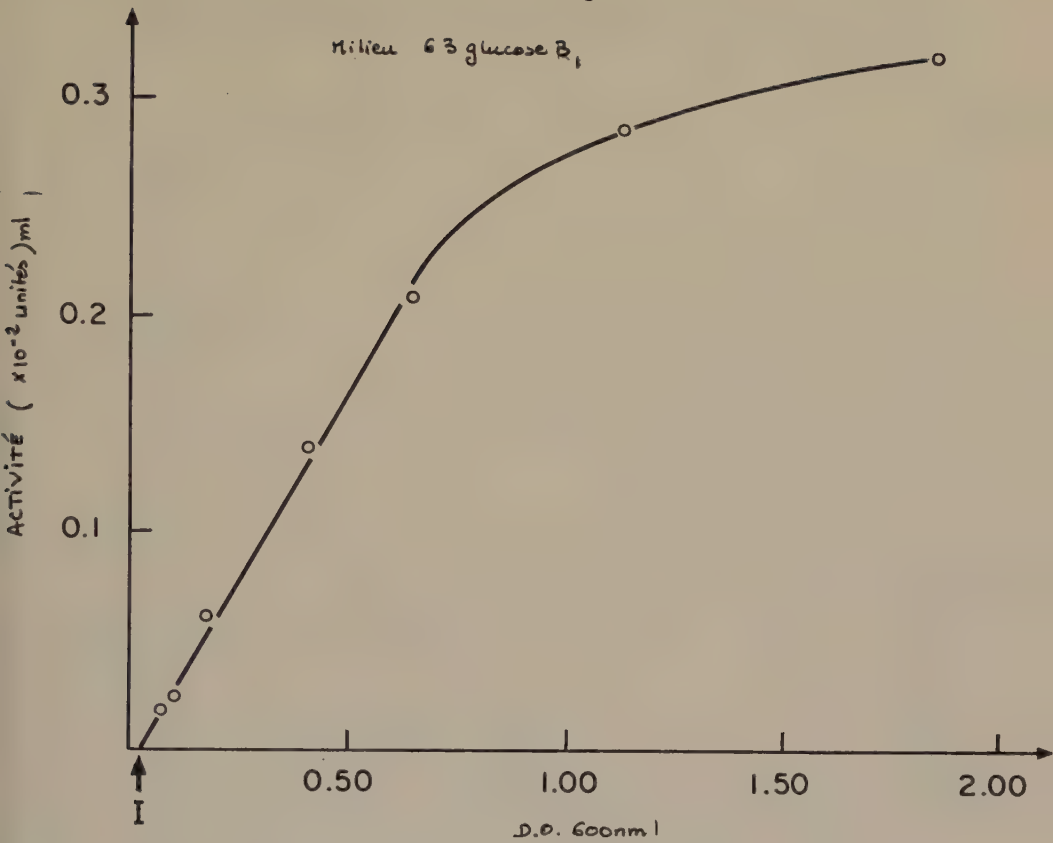
Les tableaux II_A et II_B donnent les valeurs des activités spécifiques de cultures obtenues après 8 heures de croissance dans divers milieux riches.

TABLEAU II

Milieux de culture				Activité spécifique unités/mg
63 gly B ₁	+ 0,05 %	Casamino Acides		0,5
—	+ 0,2 %	»		1,9
—	+ 0,3 %	»		1,7
—	+ 0,6 %	»		1,4
—	+ 1,1 %	»		0,8
—	+ 2 %	»		0,9

(A)

Fig II

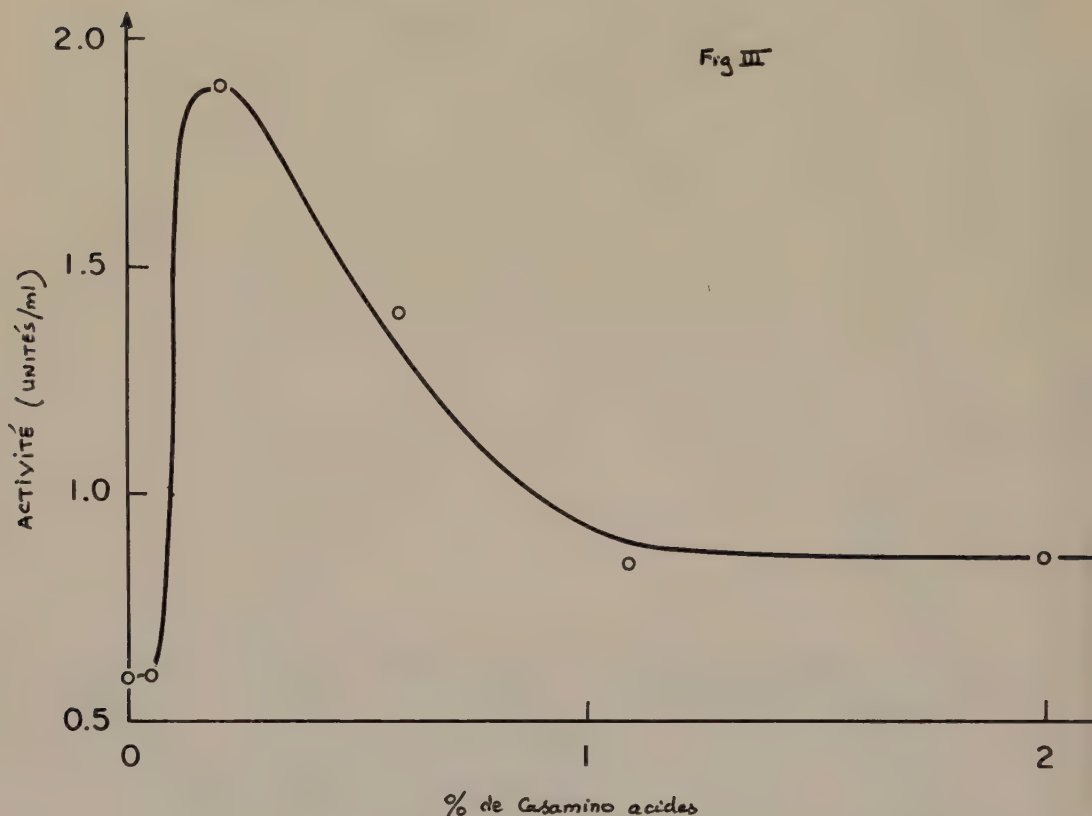


Milieux de culture	Unités/mg
Snell	1,9
Snell + Indole 0,7 mg/ml	1,7
Snell + Indole 0,7 mg/ml + Tryptophane 2 mg/ml	1,5
M L	1,4
M L + Try 2 mg/ml	2,5
M L + Try 2 mg/ml + Indole 0,07 mg/ml	1,9

(B)

On remarque, à la lecture de ces tableaux que dans tous les milieux riches testés, l'activité Tryptophanase est de 3 à 6 fois plus élevée qu'en milieu minimum, même dans un

milieu à forte concentration en Casamino acides qui, comme le montre la figure III semble inhiber quelque peu la biosynthèse de l'enzyme.



Les mesures de l'activité en cours de synthèse, déterminés en milieu riche Lennox (ML) et en casamino acides montrent (figures IV et V) que les taux différentiels ne sont pas constants au cours de la croissance bactérienne. Ils présentent un temps de latence qui précède l'apparition de l'activité enzymatique.

Ce temps de latence est de 5 à 6 générations en ML et varie de 2 à 4 générations en 63 gly B₁ + C.A., suivant la concentration en Casamino acides. Ce comportement de la biosynthèse de la Tryptophanase en milieu riche est tout à fait inhabituel. En effet, à notre connaissance, si des temps de latence précédant l'apparition d'activité catalytique d'en-

FIG. IV

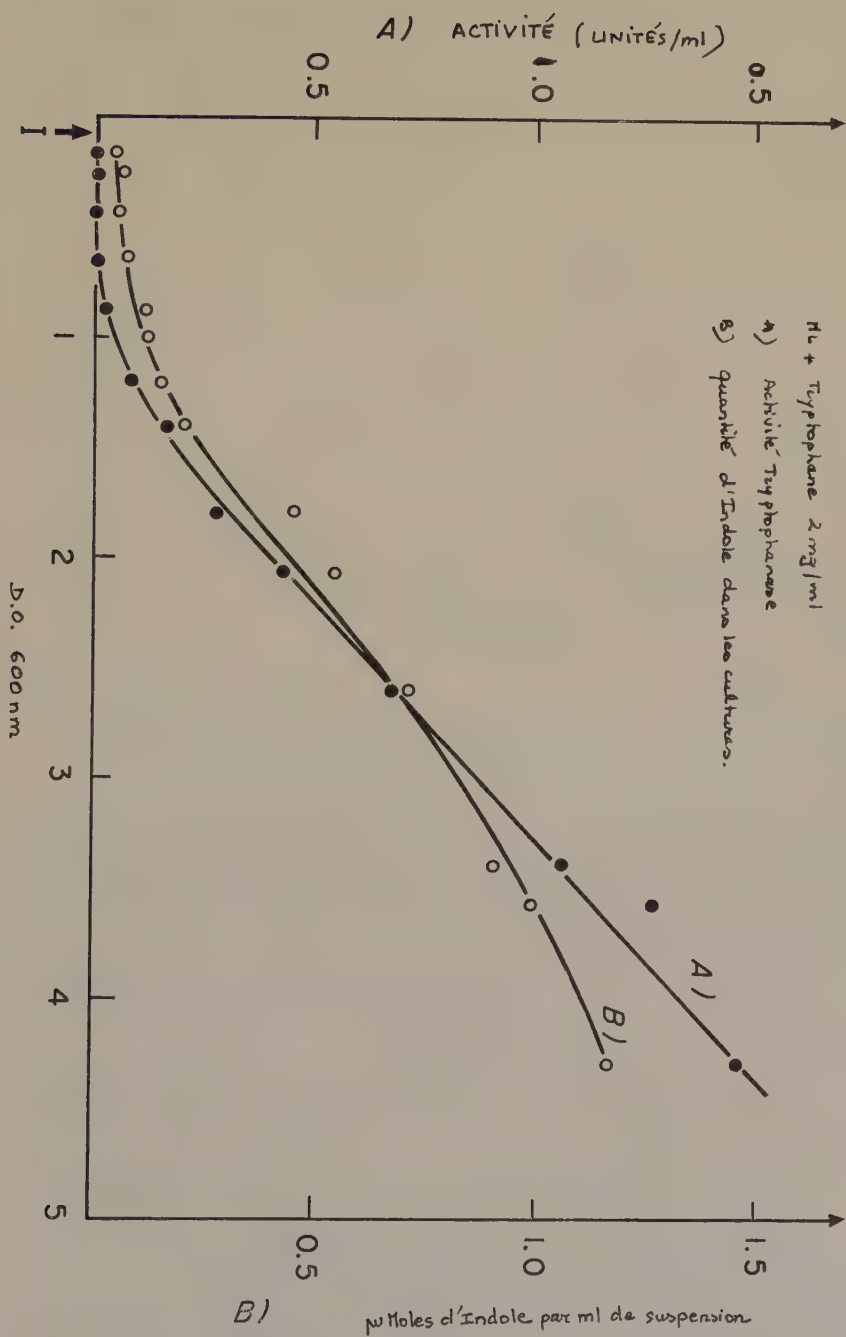
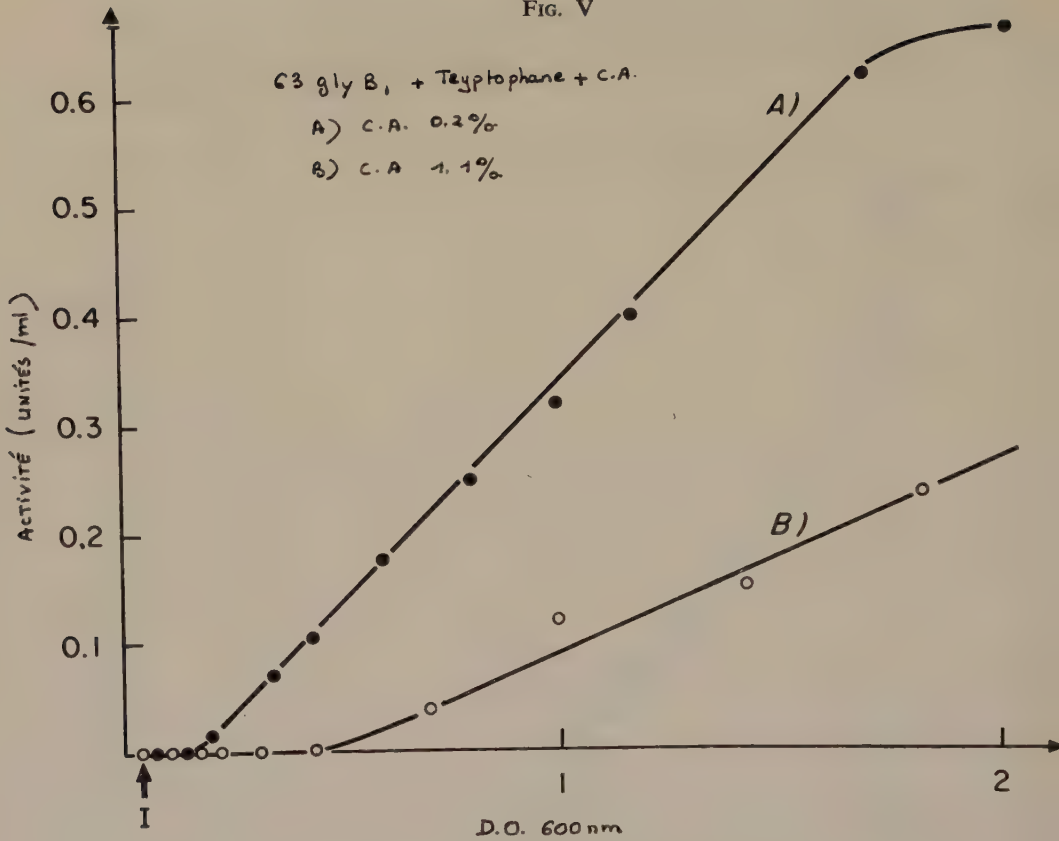


FIG. V



zymes ont déjà été observés, ils n'excèdent pas quelques minutes et sont attribués aux temps de réponses de certains ARN messagers au signal donné par l'inducteur (Pardee, 12 et Magasanik, 13 et 14).

Or, dans le cas de la Tryptophanase, le long temps de latence observé est caractéristique d'un milieu riche, et ne s'observe pas en milieu minimum.

De plus, nous avons vérifié que les propriétés de biosynthèse en milieu riche ne sont pas dues à la nature de la préculture d'ensemencement.

Comme l'indique le tableau III ci-dessous, quelque soit le milieu dans lequel est préparé l'innoculum, la biosynthèse de la Tryptophanase présente toujours en milieu riche (ML + Try 2 mg/ml) un taux différentiel de synthèse élevé et un temps de latence de 5 à 6 générations, précédant l'apparition de l'activité enzymatique.

TABLEAU III
INFLUENCE DU MILIEU D'ENSEMENCEMENT
SUR LA BIOSYNTHESE DE LA TRYPTOPHANASE

Milieu d'ensemencement	Milieu de synthèse de la TPase	Temps de latence	Taux différentiel de synthèse unités/mg
63 gly B ₁	ML + Try	5 à 6 générations	2,5
63 gly B ₁ + Try	—	5 à 6 générations	2,5
2 mg/ml	—	5 à 6 générations	2,5
ML	—	5 à 6 générations	2,5
ML + Try 2 mg/ml	—	5 à 6 générations	2,5
ML + Try 2 mg/ml	ML	5 à 6 générations	1,3

La Densité optique lors de l'ensemencement (D.O. à 600 mμ) est toujours de 0,040

Nous avons donc cherché à comprendre l'origine de ce temps de latence en milieu riche.

A priori, il n'y a aucune raison pour que les mécanismes fondamentaux qui gouvernent la biosynthèse d'un enzyme inductible dépendent du milieu de culture dans lequel il est synthétisé. Il est donc vraisemblable que dans le cas de la Tryptophanase, la nature du milieu influence les mécanismes de régulation agissant soit au niveau du repliement de la chaîne polypeptidique, soit au niveau de la biosynthèse de cette chaîne polypeptidique.

Nous avons donc entrepris une investigation plus systématique des paramètres soit physico-chimiques, soit bio-synthétiques qui pouvaient influencer le temps de latence qui précède, en milieu riche, l'apparition de l'activité Tryptophanase.

— Hypothèses physico-chimiques

Une explication du temps de latence pouvait être cherchée dans une modification, en milieu riche, du processus de l'expression de la chaîne polypeptidique de la Trypto-

phanase. On pouvait en particulier faire l'hypothèse que la chaîne polypeptidique, une fois synthétisée et repliée, doit, pour que la fonction puisse s'exprimer, subir une modification par exemple : protéolyse spécifique, phosphorylation, etc. La lenteur de cette maturation pourrait, en milieu riche, être la cause de l'existence de latence.

— *Hypothèse d'une maturation nécessaire de l'enzyme*

Si le temps de doublement des bactéries en milieu riche est trop rapide pour que l'enzyme soit synthétisé sous forme de tétramère correctement replié, dont on puisse mesurer l'activité enzymatique, il est possible néanmoins que tous les éléments précurseurs à la structuration de l'enzyme soient présents.

On peut donc envisager que si une fois la synthèse protéique arrêtée, on laisse les chaînes polypeptidiques poursuivre leur maturation dans le milieu cellulaire, elles trouveront les éléments chimiques et énergétiques nécessaires à la formation de la protéine native.

Pour vérifier cette hypothèse, un échantillon bactérien croissant en milieu riche a été prélevé pendant la phase de latence ; toute synthèse protéique a alors été arrêtée par le chloramphénicol. On a constaté que l'activité Tryptophanase de cet échantillon n'a pas été modifiée par une incubation ultérieure de 6 heures à 37° C.

Ce n'est donc pas un phénomène de maturation d'une chaîne polypeptidique déjà synthétisée qui peut expliquer le temps de latence observé en milieu riche.

II. - EFFET DU PYRIDOXAL PHOSPHATE ET DE SES ANALOGUES

Bien que l'expérience de maturation ait donné une réponse négative, il n'est pas impossible que lors de la synthèse protéique, il y ait synthèse d'une protéine irréversiblement inactivée, par suite d'une concentration intracellulaire trop faible d'un métabolite assurant la structuration de l'enzyme.

Or, la Tryptophanase est un tétramère à pyridoxal

phosphate ; comme 10 % des protéines totales d'un extrait brut d'*E. coli* K12 3000, cultivé en ML, sont de la Tryptophanase, il est concevable que la concentration intracellulaire de PLP soit trop faible pour saturer l'apoprotéine.

Nous avons donc étudié la biosynthèse de la Tryptophanase en milieu riche (ML + Try 2 mg/ml) additionné de PLP à 5×10^{-5} M (K_M pour l'apoenzyme est de 4×10^{-7} M). Elle présente exactement les mêmes caractéristiques que sans PLP additionnel : taux différentiel de synthèse élevé, temps de latence de 5 à 6 générations précédant l'apparition de l'activité enzymatique.

Ce résultat, quoique intéressant, peut néanmoins ne pas avoir de signification physiologique car on ne sait pas si le PLP pénètre à l'intérieur des bactéries. Par contre on sait (15) que dans un mélange de PLP et de ses dérivés, l'un au moins des composés pénètre dans les bactéries.

Nous avons testé l'effet sur les caractéristiques de la biosynthèse de la Tryptophanase des composés suivants : Pyridoxamine, Pyridoxine, Pyridoxal ; soit isolé, soit dans un mélange contenant en outre le PLP (concentration de chacun des composés 10^{-6} M). Les caractéristiques de la biosynthèse en milieu riche ne sont pas modifiées par la présence des dérivés du pyridoxal phosphate dans le milieu de culture.

Ces expériences montrent que si le temps de latence observé en milieu riche est dû à la synthèse d'une protéine irréversiblement inactivée, la présence de PLP ou de ses dérivés ne modifie pas la structure de la protéine synthétisée.

III. - HYPOTHESE D'UN ENZYME SYNTHETISE SOUS FORME D'APOENZYME

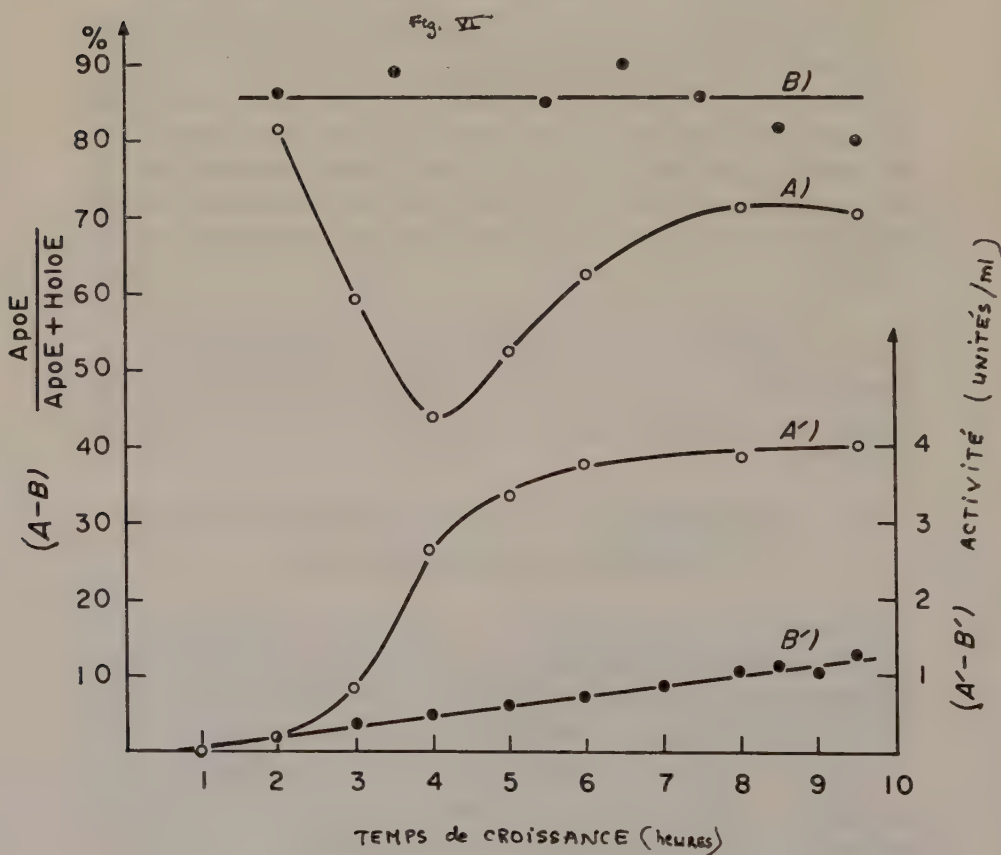
Les expériences rapportées ci-dessus étaient une indication suggérant que l'enzyme n'est pas synthétisé préférentiellement sous forme d'Apoenzyme irréversiblement inactivé ; nous avons voulu vérifier ce fait plus directement.

Pour cela, nous avons utilisé les propriétés enzymatiques suivantes : l'Holoenzyme dosé en présence ou non de PLP donne la même activité enzymatique, tandis que l'Apoenzyme

ne peut être dosé que s'il est au préalable reconstitué en Holoenzyme.

Nous avons donc suivi, au cours de la croissance bactérienne en milieu riche (ML + Try 2 mg/ml), les synthèses d'Apoenzyme et d'Holoenzyme (O. Raibaud).

La figure VI montre que lors du temps de latence qui précède l'apparition de l'activité enzymatique, il n'y a synthèse ni d'Holoenzyme, ni d'Apoenzyme. Par contre, dès la fin de la période de latence, une fraction importante de la Tryptophanase est synthétisée sous forme d'Apoenzyme activable par addition de PLP. On peut en conclure que, même lorsqu'elle est synthétisée en concentration non saturante de PLP, l'Apotryptophanase n'est pas irréversiblement inactivée. Ceci confirme qu'une insuffisance en PLP ne peut être responsable du temps de latence observé.



IV. - CONCLUSION

Les expériences relatées ci-dessus montrent qu'aucune des hypothèses testées, relative à la lenteur du folding, n'ont donné d'indication pour comprendre l'origine du temps de latence qui précède l'apparition de l'activité Tryptophanase en milieu riche ; ce n'est

- ni une maturation protéique,
- ni un manque de PLP,
- ni une synthèse de Tryptophanase sous forme d'Apoenzyme incapable de se reconstituer en Holoenzyme.

Ainsi, nous étions amenés à penser que les propriétés de biosynthèse en milieu riche étaient liées à la biosynthèse de la chaîne polypeptidique elle-même.

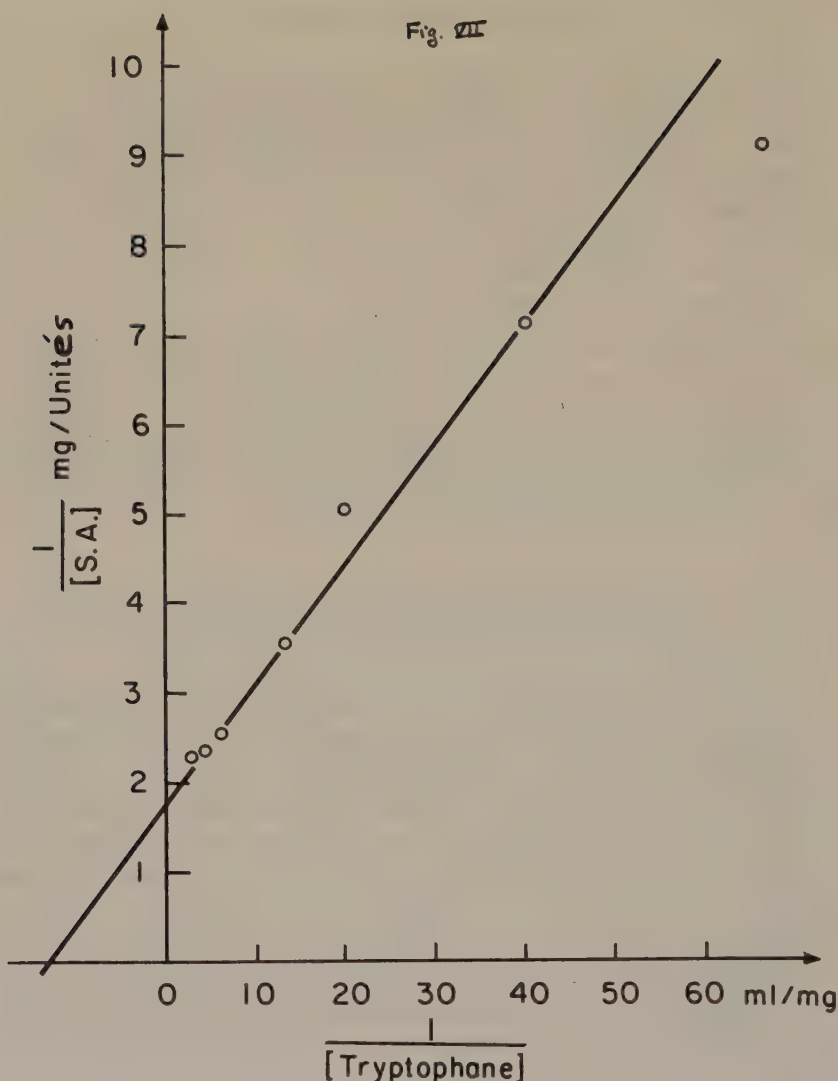
HYPOTHESES RELATIVES A LA BIOSYNTHESE DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE

La Tryptophanase est un enzyme inductible par le Tryptophane. De très fortes concentrations de tryptophane sont nécessaires pour l'induction et de plus, la présence d'Indole, d'après Snell *et coll.* (19) semble favoriser la biosynthèse de la Tryptophanase. Nous avons confirmé que l'enzyme est sensible à la répression catabolique par le glucose. Il était donc possible que le temps de latence précédant l'apparition de l'activité enzymatique en milieu riche puisse être un problème relatif soit à l'induction par le tryptophane, soit à une répression catabolique en milieu riche. Plusieurs approches dans chacune de ces deux directions ont été utilisées.

I. - HYPOTHESES RELATIVES A L'INDUCTION

A) Effet de la concentration de Tryptophane

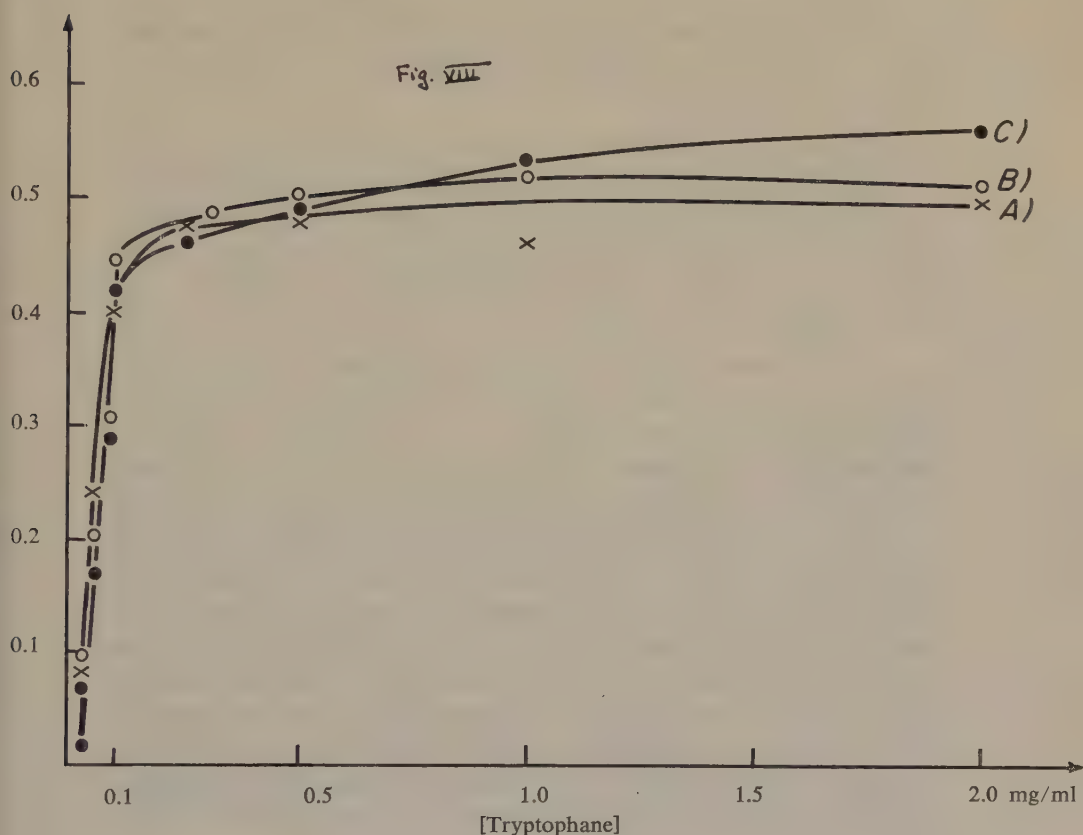
Compte tenu des diverses valeurs de L-Tryptophane utilisées suivant les auteurs, pour induire la Tryptophanase, nous avons déterminé la concentration de Tryptophane permettant d'obtenir la moitié de l'activité spécifique maximale. Cette valeur (figure VII) est de $(3,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$ M.



Elle est analogue à celle déterminée par Bestford et De Moss (5) ; à savoir $(5,7 \pm 3,5) \cdot 10^{-4}$ M.

De plus, la figure VIII montre que la concentration de L-tryptophane nécessaire pour induire la Tryptophanase à son taux d'activité maximum est de 1 à 2 mg/ml, en milieu minimum simple ou additionné de Casamino acides. Enfin, bien que le milieu L contienne déjà du tryptophane à environ 400 γ /ml, l'addition de tryptophane à 2 mg/ml augmente la synthèse de Tryptophanase.

La concentration de Tryptophane nécessaire à l'induction est notablement plus élevée que les concentrations d'inducteurs généralement utilisés (10^{-3} M pour la β -galactosidase).



On pouvait se demander si la perméation du Tryptophane à de telles concentrations était tout à fait normale, et en particulier si en milieu riche le temps de latence observé n'était pas dû à une inhibition, soit de la formation, soit de l'induction des perméases, assurant l'entrée du tryptophane dans le milieu intracellulaire.

Nous avons donc effectué quelques expériences de perméation du Tryptophane, afin de pouvoir répondre à la question précise de savoir si le problème de perméation du

Tryptophane était ou non impliqué dans l'existence du temps de latence observé en milieu riche.

B) Perméation du Tryptophane

Les travaux de Brown (16) ont montré que la perméation du Tryptophane dans les bactéries d'*E. coli* K12 se fait par trois perméases différentes dont l'une seulement est spécifique du Tryptophane.

Burrous et De Moss (17) ont montré que chez *E. coli* la perméase spécifique au Tryptophane est induite par le Tryptophane lui-même. Le maximum d'induction est obtenu en une heure avec du Tryptophane à 5 γ /ml, et de plus fortes concentrations de Tryptophane, jusqu'à 500 γ /ml, ne répriment pas cette induction.

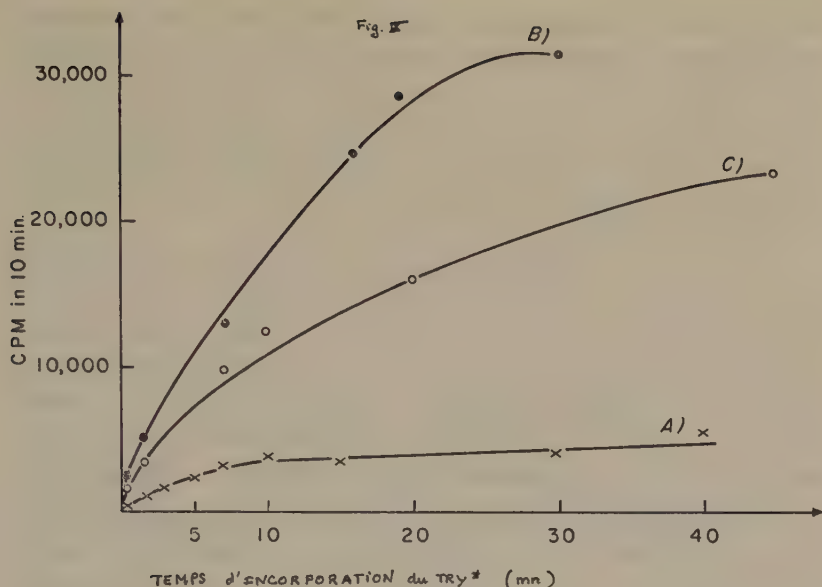
Or, dans nos études sur la biosynthèse de la Tryptophanase en milieu riche ML, où le temps de latence est équivalent à celui trouvé en ML + Try 2 mg/ml, la concentration de Tryptophane est de 400 γ /ml et n'est donc pas inhibitrice de la synthèse des perméases.

Nous avons donc toutes raisons de penser que le Tryptophane entre dans les cellules. Toutefois, la pénétration de cet amino acide dans les bactéries n'est peut-être pas assez rapide pour assurer une concentration intracellulaire suffisante. En effet, le Tryptophane joue, dans la cellule, plusieurs rôles : inducteur de la Tryptophanase, co-répresseur de l'opéron « tryptophane » (18), substrat de la Tryptophanase ; mais surtout, il est incorporé dans les protéines, très rapidement lors de la croissance en milieu riche où le temps de doublement est particulièrement court.

Nous avons donc examiné comment se comporte le pool interne de tryptophane lors de l'induction de la Tryptophanase.

Les expériences d'accumulation de Tryptophane radioactif (cf. Matériels et Méthodes) à l'intérieur des bactéries ont été faites selon Burrous (17) en milieu riche et en milieu minimum (l'expérience a été réalisée en 63 gly B₁ + C.A., car en ML une partie du Tryptophane incorporé pouvait n'être pas décelé par sa radioactivité).

Comme le montre la figure IX, la présence de Trypto-



phane augmente beaucoup l'accumulation de celui-ci. La différence observée entre le milieu minimum et le milieu riche est beaucoup trop faible pour expliquer le temps de latence en milieu riche.

Tant en milieu riche qu'en milieu minimum, l'induction de la Tryptophanase nécessite donc une concentration extra- et intracellulaire inhabituellement élevée de Tryptophane. Cette observation pouvait alors suggérer que le véritable inducteur de la Tryptophanase n'était pas le Tryptophane lui-même, mais un de ses dérivés dont la présence serait régulée différemment en milieu minimum et en milieu riche.

C) Le Tryptophane n'est pas le vrai inducteur

Nous avons donc cherché cet inducteur éventuel parmi les analogues structuraux du Tryptophane, en particulier chez les inhibiteurs connus de l'activité catalytique de cet enzyme.

La tryptamine, la cynurénine et l'acide anthranilique ne sont pas inducteurs de la Tryptophanase, tant en milieu minimum qu'en milieu riche ; de plus, la cynurénine ne modifie ni le taux différentiel de synthèse, ni le temps de latence qui précède l'apparition de l'activité Tryptophanase en milieu riche.

L'indole, inhibiteur à grande affinité pour l'enzyme, est utilisé, par de nombreux auteurs, associé au Tryptophane pour l'induction de la Tryptophanase. Nous avons vérifié que l'indole seul n'est pas inducteur ; nous avons mesuré les concentrations d'indole dans les suspensions bactériennes au cours de la croissance bactérienne tant en milieu minimum qu'en milieu riche.

Les figures I_b et III_b montrent que l'apparition d'indole suit exactement l'apparition de l'activité Tryptophanase. Pendant toute la période de latence la concentration d'indole en milieu riche correspond à celle du début de synthèse de l'enzyme en milieu minimum ; en fin de synthèse, les concentrations d'indole dans les deux milieux sont voisines quoique les activités Tryptophanase soient notablement différentes.

Enfin l'addition d'indole au Tryptophane en milieu riche ne modifie ni le taux différentiel de synthèse, ni le temps de latence. L'indole n'est donc pas coinducteur pour la biosynthèse de la Tryptophanase.

D'autres composés, non analogues du Tryptophane, et impliqués dans les régulations de la biosynthèse des amino acides aromatiques, ont été testés pour l'induction de la Tryptophanase et n'ont donné que des résultats négatifs ; parmi eux la phénylalanine, la tyrosine. D'autre part, des inhibiteurs de l'activité enzymatique (acide anthranilique et cynurénine) non inducteurs de la Tryptophanase, inhibent l'induction par le Tryptophane (résultats préliminaires).

Aucune des approches classiques relatives à l'induction ne permettant de comprendre l'origine du temps de latence en milieu riche, nous avons étudié l'autre mécanisme connu pour influencer la régulation de la biosynthèse de la Tryptophanase : la répression catabolique.

II. - HYPOTHESES RELATIVES

A LA REPRESSION CATABOLIQUE

A) Répression catabolique par la glucose

La répression de la synthèse de certains enzymes bactériens inductibles comme la β -Galactosidase (19) et la Trypto-

phanase (1) a été observée dans des milieux de culture contenant à la fois du glucose et du sulfate d'ammonium.

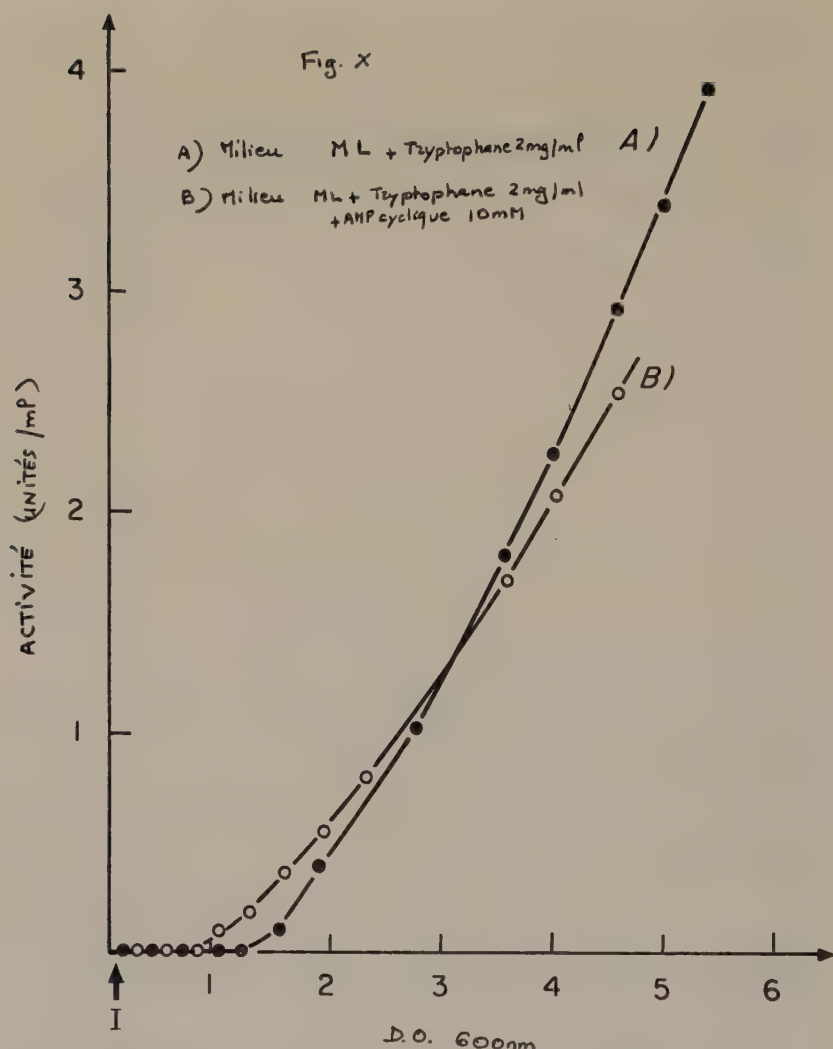
Des études plus systématiques sur la répression catabolique de la Tryptophanase ont été faites par De Moss *et coll.* (4 et 5). Nous avons confirmé ces résultats dans le cas de la souche 3000 d'*E. coli* K12, comme l'indique le tableau IV, et montré que cette répression pouvait être partiellement levée par l'AMP-cyclique.

TABLEAU IV
REPRESSION CATABOLIQUE

Source de carbone	Concentration finale d'AMP-cyclique	Activité spécifique en unités/mg
Lactose		0,7
Lactose	$5 \times 10^{-4}\text{M}$	1,5
Lactose	$3 \times 10^{-3}\text{M}$	3,4
Glycérol		0,6
Glycérol	$5 \times 10^{-4}\text{M}$	0,6
Glycérol	$3 \times 10^{-3}\text{M}$	0,9
Glucose		0,1
Glucose	$5 \times 10^{-4}\text{M}$	0,6
Glucose	$3 \times 10^{-3}\text{M}$	0,8

Cultures de 5 ml (pendant 10 hr à 37° C) en 63 B, + source de carbone à 0,4 % finale, additionné de Try 0,3 % (3 mg/ml)

La sensibilité de la Tryptophanase à la répression catabolique par le glucose en milieu minimum nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'en milieu riche certains éléments présents pouvaient produire une répression catabolique analogue qui serait levée par l'AMP-cyclique. Nous avons tout d'abord confirmé que la β -Galactosidase ne présente pas de temps de latence en milieu riche et nous avons étudié la biosynthèse de la Tryptophanase en milieu riche en présence d'AMP-cyclique à une concentration de $4 \times 10^{-3}\text{M}$, sans traiter les cultures à l'EDTA, comme le font Pastman *et coll.* (4).



Comme le montre la figure X, l'AMP-cyclique n'a aucun effet ni sur le taux différentiel de synthèse, ni sur le temps de latence observé en milieu riche. Cette observation indique que les mécanismes impliqués dans l'existence du temps de latence en milieu riche ne sont pas liés à une répression catabolique par la source de carbone.

B) Répression catabolique par la source d'azote

Depuis 1971, de nouvelles perspectives sont apparues dans l'étude de la répression catabolique. En effet, Maga-

sanik et ses collaborateurs ont montré que des enzymes de dégradation de certains acides aminés, tels que l'Histidase de *Klebsiella aerogenes* (K. aerogenes) (20) ne sont, en fait, sensibles à la répression catabolique par le glucose que lorsque ces bactéries sont cultivées en présence de ce sucre et de sulfate d'ammonium comme source d'azote.

Lorsque l'on oblige de telles cellules à utiliser l'histidine comme seule source d'azote en présence de glucose, la répression catabolique de l'histidase est très largement diminuée tandis que dans ces mêmes conditions, la répression catabolique de la β -Galactosidase est augmentée. D'où l'existence de deux types de répression catabolique bien distincts. De plus, les travaux de Magazanik sur l'histidase de *K. aerogenes* l'ont conduit à la découverte de la glutamine synthétase comme enzyme clef de l'utilisation de l'azote par ce type de bactéries. L'ensemble de ces données, ainsi que celles sur la Tryptophanase montrent que les caractéristiques de la sensibilité de cet enzyme à la répression catabolique par le glucose sont assez différentes de celles de la β -Galactosidase, et nous ont conduits à étudier la répression catabolique de la Tryptophanase en fonction de la source d'azote utilisée par les bactéries.

Les tableaux V et VI, quoique préliminaires, indiquent que le remplacement de sulfate d'ammonium par le Tryptophane comme source d'azote ne lève pas la répression catabolique de la biosynthèse de la Tryptophanase, exercée par le glucose.

Cependant, ces expériences sont techniquement difficiles à réaliser car les bactéries qui se multiplient en présence de tryptophane comme seule source d'azote ont un temps de doublement d'environ 24 h. De plus, l'utilisation du tryptophane implique sa dégradation avec production d'indole, très toxique pour les bactéries, ce qui se remarque par la couleur rose que prennent les cultures.

Nous considérons donc le résultat précédant uniquement comme une indication montrant que la répression catabolique par le glucose à laquelle est sensible la Tryptophanase, n'est pas due à la présence de sulfate d'ammonium.

TABLEAUX V ET VI

EFFET DE LA SOURCE D'AZOTE
SUR LA BIOSYNTHESE DE LA TRYPTOPHANASE

63 B ₁ sans azote	20 % Glucose	Tryptophane 5×10^{-2} M	Serine 20 %	(NH ₄) ₂ SO ₄ 20 %	Unités/mg
4,4 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,1 ml	0,04
4,6	0,1	0,2	0,2	—	0,03
4,7	0,1	0,2	—	0,1	0,03
4,8	0,1	0,2	—	—	0,002
3,9	0,1	1 ml (2 mg/ml)	—	—	—
				0,1	0,5
4,0	0,1	1	—	—	0,004

63 B ₁	Glucose 20 %	20 % Glycerd	1 % Tryptophane	(NH ₄) ₂ SO ₄ 20 %	Unités/mg
4,7	—	0,1	0,2	—	0,15
4,6	—	0,1	0,2	0,1	0,54
3,9	—	0,1	1	—	0,01
3,8	—	0,1	—	0,1	0,8
3,9	0,1	—	1	—	—
			(2 mg/ml)	—	0,002
3,8	0,1	—	1	0,1	0,1

Dans tous les cas, il s'agit de cultures de 10 hr, effectuées à 37° C.

Les expériences précédentes ayant été réalisées en milieu minimum, nous nous sommes néanmoins demandés si la présence de sulfate d'ammonium dans le ML n'était pas responsable du temps de latence ; nous avons constaté que l'addition de sulfate d'ammonium à 2,5 % final, dans une culture en ML + Try 2 mg/ml, ne modifie ni le temps de latence, ni le taux différentiel de synthèse de l'enzyme.

Nous avons de plus vérifié que la présence de glutamine à 0,4 % finale, ajoutée à du ML + Try 2 mg/ml ne modifie ni le taux différentiel de synthèse, ni le temps de latence. La présence de glutamine, produit de la glutamine synthétase

enzyme clef de l'utilisation de l'azote chez *K. aerogenes* n'a pas d'effet sur la biosynthèse de la Tryptophanase en milieu riche.

Bien qu'elles demeurent encore préliminaires, ces données nous permettent de conclure qu'il est très peu vraisemblable que le temps de latence observé en milieu riche soit dû à une répression catabolique dite azotée ; ce qui n'exclut pas pour autant que le temps de latence puisse être dû au mécanisme d'utilisation de l'azote par les bactéries. En effet, des mutants constitutifs pour le contrôle de la synthèse de l'histidine, et insensibles à la répression catabolique, excrètent un produit du catabolisme du tryptophane et semblent avoir une Tryptophanase aussi insensible à la répression catabolique.

La sensibilité de la Tryptophanase à la répression catabolique ne semble donc être comparable, ni à celle de la β -Galactosidase, ni à celle de l'histidiasse. Des études plus systématiques, dépassant le propos de ce travail, devraient — selon nous — être poursuivies par l'étude du rôle physiologique éventuel de la Tryptophanase en relation avec les mécanismes de régulation impliqués dans l'utilisation de l'azote par les bactéries.

En résumé, pour le problème que nous nous étions posés, aucune des approches concernant la répression catabolique ne semble apporter d'explication aux propriétés d'induction de la Tryptophanase en milieu riche.

MISE EN EVIDENCE D'UN METABOLITE NECESSAIRE A L'INDUCTION DE LA TRYPTOPHANASE EN MILIEU RICHE

A ce stade du travail, aucune des hypothèses testées pour expliquer le temps de latence précédant l'apparition de l'activité enzymatique n'avait donnée de réponse positive. Nous savions que ce n'était ni un enzyme incorrectement replié, ni une carence en coenzyme qui pouvait expliquer le temps de latence. Ce n'était apparemment ni un problème d'induction, tant au niveau perméation qu'à la nature de l'inducteur direct ; ce n'était pas non plus un problème dû à une répression catabolique, soit azotée, soit carbonée.

Nous avons donc émis l'hypothèse que, pendant la phase de latence, un composé présent dans le milieu inhibe l'induction de la Tryptophanase et que ce composé est épuisé par les bactéries à la fin de cette phase de latence.

Les bactéries se divisant très rapidement en milieu riche, on pouvait penser que l'aération du milieu était insuffisante et que, à partir d'une certaine concentration bactérienne, l'oxygène pouvait être trop rapidement consommé pour assurer une croissance véritablement aérobie. Comme d'autre part divers travaux (Beggs, 3) ont montré que *E. coli* peut synthétiser la Tryptophanase en anaérobiose, nous avons étudié l'influence d'une suroxygénation du milieu sur la durée du temps de latence.

I. - INFLUENCE DE L'OXYGENATION DU MILIEU

On fait croître des bactéries *E. coli* K12 3000 en ML + tryptophane à 2 mg/ml en présence d'un courant d'oxygène de 0,3 kg/cm², filtré et amené à 37° C, par passage dans de l'eau distillée.

On constate que ni le temps de latence, ni le taux différentiel de la synthèse de la Tryptophanase ne sont modifiés par la suroxygénation.

De ces expériences, on peut conclure que la phase de latence n'est pas due à une répression de la biosynthèse de la Tryptophanase en aérobie.

On pouvait donc penser qu'un composant, présent dans le milieu riche, autre que l'oxygène, était responsable du temps de latence qui suit l'induction par le tryptophane.

II. - HYPOTHESE D'UN INHIBITEUR DE L'INDUCTION

Pour vérifier l'hypothèse du rôle d'un tel inhibiteur, dont nous devons postuler également, puisque la synthèse de Tryptophanase est possible, qu'il est dégradé par les bactéries au cours de la phase de latence. Nous avons cherché à « épuiser » le milieu de ce composé.

Pour cela, on sépare, après la fin de la phase de latence, le milieu de culture et les bactéries.

Lorsque ce milieu épuisé est inoculé avec des bactéries

fraîches, dans les conditions habituelles d'ensemencement, la phase de latence et le taux différentiel de synthèse ne sont pas modifiés (tableau VII, case A'₁).

L'hypothèse d'un composé inhibiteur dégradable doit donc être rejetée.

On pouvait alors penser que les bactéries devaient synthétiser et accumuler lors des premiers doublements, un métabolite nécessaire à l'induction de la Tryptophanase. Ce métabolite pourrait être soit un co-inhibiteur, soit le véritable inducteur de cet enzyme.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons séparé, après la fin de la phase de latence, le milieu de culture et les bactéries. Ces bactéries ont été utilisées pour inoculer du ML + Tryptophane (2 mg/ml) frais dans les conditions habituelles d'ensemencement. Là encore, la phase de latence et le taux différentiel de synthèse ne sont pas modifiés (tableau VII, case B₁).

Ces deux dernières expériences démontrent que la fin de la phase de latence ne peut être expliquée ni par une modification stable du milieu, ni par une modification stable des bactéries. Dans ce cas, où chercher le métabolite responsable du temps de latence, si on ne le trouve ni dans les bactéries, ni en dehors ?

TABLEAU VII
TRANSFERTS ET ANTOTRANSFERTS

Milieu de réensemencement Innoculum	D.O. _{0.001 mm} au début de la croissance bactérienne	Milieu riche ML + Try 2 mg/ml	Milieu riche ML + Try 2 mg/ml
Bactéries fraîches	0.040	(A ₁) +	(A' ₂) non testé
	1.200	(A ₂) —	(A' ₁) +
Culot bactérien après épuisement	0.040	(B ₁) +	(B' ₁) +
	1.150	(B ₂) —	(B' ₂) —

Le signe + correspond à un temps de latence de la biosynthèse de Tryptophanase. Ce temps s'extrapole à D.O._{0.001 mm} = 1,00.

Le signe — correspond à l'absence de temps de latence.

La logique imposait donc de réaliser des expériences dites d'autotransfert dans lesquelles nous avons séparé, après la phase de latence, le milieu de culture et les bactéries ; ces bactéries ont été utilisées pour inoculer le même milieu épuisé, dans les conditions habituelles d'ensemencement. A nouveau, ni la phase de latence, ni le taux différentiel de synthèse n'ont été modifiés (tableau VII, case B'₁).

Ce dernier résultat entre quelque peu en contradiction avec l'hypothèse initiale de l'accumulation d'inducteur ou coinducteur indispensable à la biosynthèse de la Tryptophanase.

En effet, si ce composé existe, on doit nécessairement trouver une de ces traces, soit dans le milieu de culture, soit dans les bactéries, soit dans le mélange milieu et bactéries. Or, il n'en est rien, c'est pourquoi nous avons pensé qu'il s'agissait d'un artefact technique.

Afin de nous en assurer, nous avons voulu répéter une expérience d'autotransfert, mais sans changer la concentration bactérienne lors du réensemencement. Le temps de latence a alors disparu (tableau VII, case B'₂), alors que le taux différentiel de synthèse n'a pas été modifié.

On voit donc que, lorsque l'autotransfert est réalisé en réensemencant à faible concentration bactérienne, la phase de latence existe alors qu'elle disparaît si le réensemencement est fait à forte concentration bactérienne.

L'influence de la concentration bactérienne de réensemencement a donc été étudiée plus systématiquement. Le tableau VIII montre que la phase de latence n'est observée que si la densité optique à 600 nm, lors de l'inoculation, est inférieure à 1, c'est-à-dire à la densité optique correspondant à la fin du temps de latence observé en milieu riche.

Il nous fallait donc déterminer si l'influence de la concentration bactérienne mise ainsi en évidence était propre aux expériences d'autotransfert, ou si elle était caractéristique, dans tous les cas, de la biosynthèse de la Tryptophanase.

Nous avons donc étudié l'influence de la concentration de l'inoculum sur les caractéristiques de la biosynthèse de la Tryptophanase.

TABLEAU VIII
AUTOTRANSFERTS EN MILIEU RICHE
Influence de la concentration bactérienne
lors du réensemencement

Concentration bactérienne D.O. ⁶⁰⁰ mm	Temps de latence
0,040	+
0,280	+
0,400	+
0,600	+
1,150	—
1,700	—

Signe + = temps de latence à la biosynthèse de la tryptophanase.
Signe — = absence de temps de latence.

Le tableau IX montre que lors d'ensemencements de milieu frais avec des bactéries fraîches, la phase de latence n'est plus observée si la densité optique d'ensemencement est supérieure à 1.

TABLEAU IX
EFFET DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE
LORS DE L'ENSEMENCEMENT
SUR LA BIOSYNTHESE DE LA TRYPTOPHANASE

D.O. ⁶⁰⁰ mm lors de l'ensemencement	Temps de latence	Taux différentiel de synthèse
0,040	+	2,2
0,210	+	1,9
0,610	+	2,0
1,300	—	2,2
1,800	—	2,1

Culture en ML + Try 2 mg/ml, inoculées à la D.O.⁶⁰⁰ mm voulue par des bactéries en 63 gly B₁.

Signe + = existence d'un temps de latence de 5 à 6 générations.
Signe — = absence de temps de latence.

L'ensemble de ces expériences indique donc que, en milieu riche, la Tryptophanase ne peut être induite que si la concentration bactérienne de la culture est suffisamment élevée. L'hypothèse la plus simple permettant de rendre compte de cette propriété est que l'induction de la Tryptophanase exige, au moins en milieu riche, la présence d'un métabolite diffusible, labile, synthétisé par les bactéries. Il doit être diffusible pour rendre compte de l'influence de la concentration bactérienne ; il doit être instable car on ne le retrouve pas dans le milieu épuisé.

L'une des questions relatives à ce métabolite était sa relation avec le Tryptophane, inducteur utilisé de la Tryptophanase. Le tryptophane étant également substrat de la Tryptophanase, on pouvait penser que ce métabolite était un produit de l'une des multiples réactions catalysées par cet enzyme. Pour le vérifier, nous avons examiné la synthèse éventuelle de ce métabolite par des bactéries incapables de synthétiser la Tryptophanase.

Pour cela, on fait croître des bactéries TPase (souche AB2151) dans du milieu riche (ML + Try 2 mg/ml) ; lorsque la D.O. à 600 nm atteint 0,200, on ajoute un innoculum en 63 gly B₁ de bactéries TPase⁺ dans le rapport de concentrations bactériennes :

$$\frac{[\text{TPase}^+]}{[\text{TPase}^-] + [\text{TPase}^+]} = \frac{1}{3}$$

et on mesure la biosynthèse de la Tryptophanase.

La courbe de la figure XI montre que le temps de latence persiste jusqu'à une densité optique bactérienne de 3 environ. A ce stade de la croissance bactérienne, la contribution des bactéries TPase⁺ à la D.O. est d'environ 1, car le temps de doublement des deux souches est le même.

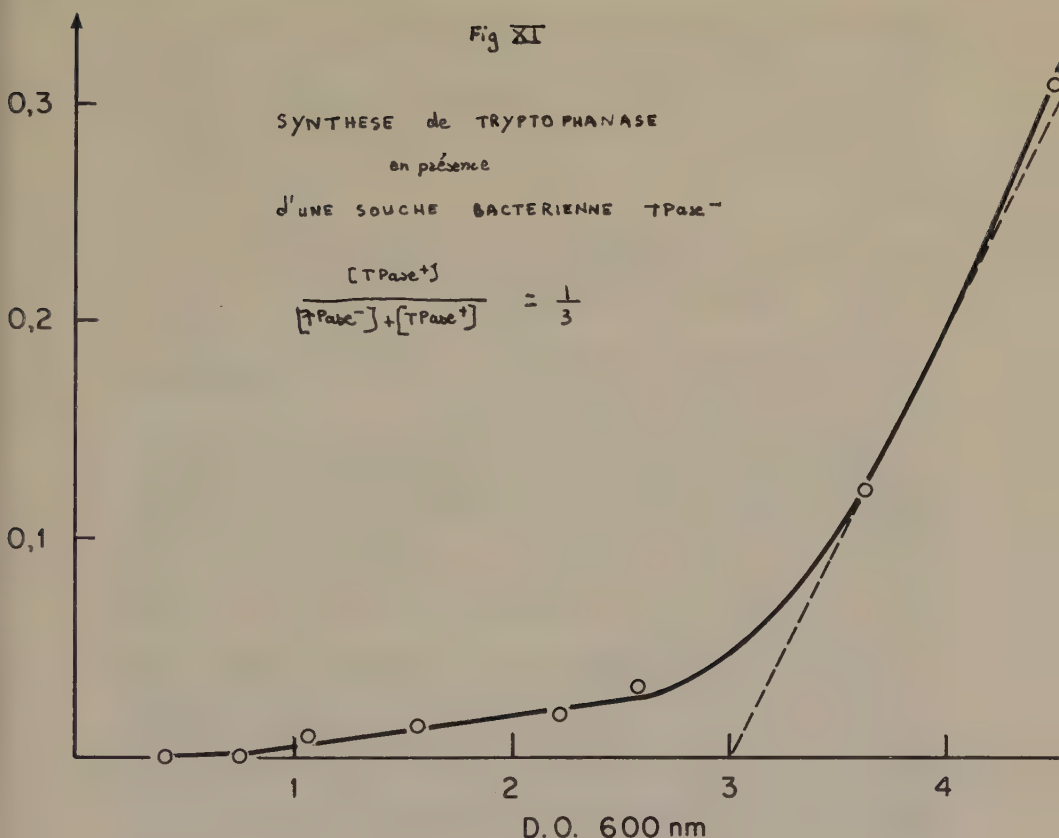
On peut donc en conclure que le comportement de la biosynthèse de la Tryptophanase est indépendant de la présence des bactéries TPase⁻ : le taux différentiel de synthèse est de 3 unités/mg (pour les TPase⁺) et le temps de latence avant induction de la Tryptophanase s'extrapole à une D.O._{600 nm} = 1 de bactéries TPase⁺.

Le métabolite, diffusible et instable, nécessaire à l'induction de la Tryptophanase en milieu riche, n'est donc

Fig XI

SYNTHÈSE de TRYPTOPHANASE
en présence
d'une souche BACTÉRIENNE TPase⁻

$$\frac{[TPase^{+}]}{[TPase^{-}] + [TPase^{+}]} = \frac{1}{3}$$



produit que par des bactéries capables de synthétiser la Tryptophanase.

CONCLUSION

La recherche des conditions de croissance des bactéries Hfr 3000 d'*E. coli* K12, telles que celles-ci puissent synthétiser de la Tryptophanase avec une activité spécifique élevée, nous a permis de mettre en évidence deux propriétés tout à fait inhabituelles de la biosynthèse de cet enzyme en milieu riche :

— l'existence d'un temps de latence de 3 à 5 générations, observable lorsque la densité optique d'innoculation est inférieure à D.O. = 1 ;

— un taux différentiel de synthèse 5 fois plus élevé

qu'en milieu minimum, conduisant à des extraits bruts dont 10 % des protéines sont de la Tryptophanase.

Pour expliquer ce taux différentiel de synthèse particulièrement élevé, et principalement son augmentation importante en milieu riche, on peut faire appel à deux observations :

— d'une part, au cours de la croissance exponentielle en milieu riche, le chromosome bactérien porte plusieurs fourches de réplication (Worcel, 21) ;

— d'autre part, le gène de structure de la Tryptophanase (Tna) est localisé très près du point d'initiation de la réplication (Taylor, 22 ; Caro, 23).

On peut donc en conclure que lors de la croissance en milieu riche, plusieurs copies du gène Tna sont présentes sur chaque chromosome en cours de réplication. On a donc fortement amplifié, à cause de la proximité de Tna et du point d'initiation de la réplication, l'effet de dose de gène décrit par Worcel (24).

Par contre, l'interprétation de la phase de latence s'est révélée plus complexe. Il n'y a aucune indication montrant que les mécanismes fondamentaux qui gouvernent la biosynthèse de cet enzyme dépendent du milieu de culture dans lequel il est synthétisé ; on était donc amené à penser que le temps de latence observé en milieu riche était dû à une modulation de l'expression de ces mécanismes biosynthétiques fondamentaux. L'une de ces modulations — particulièrement séduisante — concernait le repliement *in vivo* de cet oligomère à coenzyme : on pouvait, en effet, attribuer le temps de latence observé à la biosynthèse :

— soit d'une chaîne polypeptidique n'ayant pas subi la transformation nécessaire pour que la fonction catalytique de l'enzyme puisse s'exprimer,

— soit d'une protéine irréversiblement inactivée.

Or, nous avons montré que ce n'est :

— ni une maturation de la chaîne polypeptidique,

— ni une synthèse d'Apoenzyme incapable de se transformer en Holoenzyme en présence de PLP,

— ni un manque de PLP ou de ses dérivés qui peuvent être impliqués dans le temps de latence observé en milieu riche.

Une autre modulation des mécanismes fondamentaux de la biosynthèse de la Tryptophanase pouvait être recherchée dans les paramètres qui influencent directement la biosynthèse de l'enzyme : tels que l'induction et la répression catabolique.

Cependant,

— ni la sensibilité de la Tryptophanase à la répression catabolique par le glucose (ou par une autre source de carbone),

— ni l'effet de la source d'azote sur cette répression catabolique,

ne sont susceptibles d'expliquer le temps de latence.

Le fait que pour son induction, la Tryptophanase demande de fortes concentrations de tryptophane (10^{-2} M), posait le problème :

— d'une part, de l'insuffisance éventuelle, en milieu riche, de l'activité des perméases à tryptophane,

— et d'autre part, de la recherche d'un analogue structural du tryptophane induisant la Tryptophanase.

Là encore, aucune explication du temps de latence n'a pu être trouvée.

Les réponses négatives aux expériences que nous avons effectuées dans toutes ces directions nous ont conduit à réaliser les expériences de transfert décrites ci-dessus et qui démontrent l'existence d'un métabolite diffusible instable, qui serait :

— soit le véritable inducteur,

— soit un coinducteur

de la Tryptophanase.

L'intérêt de cette conclusion est de plusieurs ordres.

D'une part, elle permet de rendre compte du comportement d'*E. coli* en milieu riche : les bactéries ne se comportent pas individuellement, mais en relation avec leurs voisines, pour la synthèse de la Tryptophanase ; isolées ou à faible densité optique, elles ne synthétisent pas cet enzyme, alors que par l'intermédiaire de ce métabolite diffusible, elles deviennent capables, à forte densité optique, de produire de la Tryptophanase.

D'autre part, l'existence de ce métabolite peut ouvrir la voie à l'étude du rôle physiologique de la Tryptophanase d'*E. coli*. Le rôle généralement reconnu à cette protéine est l'utilisation du tryptophane comme source de carbone ou d'azote. Or,

— ni les conditions de l'induction,

— ni la difficulté d'*E. coli* à utiliser cet amino acide pour sa croissance,

ne peuvent rendre compte du fait que cette protéine ait été sélectionnée au cours de l'évolution.

En effet, le tryptophane — amino acide rare — n'est vraisemblablement pas souvent présent, dans le milieu naturel d'une entéro-bactérie aux concentrations très élevées nécessaires à l'induction. D'autre part, *E. coli* utilise très mal le pyruvate ou l'ammoniac produits par la dégradation du tryptophane. De plus, l'indole, autre produit de cette dégradation, est fortement toxique pour *E. coli*.

Il apparaît donc vraisemblable qu'un autre rôle physiologique de cet enzyme doit exister.

Il n'est pas impossible que le métabolite impliqué dans le métabolisme de la Tryptophanase soit l'un des composés entrant dans le mécanisme d'utilisation de l'azote par les bactéries puisque des mutants constitutifs pour l'histidase excrètent un produit du catabolisme du tryptophane (20), et que pour de tels mutants, la sensibilité à la répression catabolique de l'histidase et de la Tryptophanase est abolie.

Les résultats obtenus au cours de notre travail suggèrent justement que le métabolite impliqué dans l'existence du temps de latence pour l'induction de la Tryptophanase serait un produit du catabolisme du tryptophane. En effet, seuls les mutants Tryptophanase⁺ peuvent, en présence de tryptophane, synthétiser ce métabolite. De plus, tous les analogues du tryptophane qui sont substrats (4-hydroxy, 5-hydroxy, 4-méthyl, 5-méthyl, 6-méthyl, etc.) sont également inducteurs de la Tryptophanase, alors que tous les analogues qui ne sont pas substrats, même s'ils sont inhibiteurs de l'enzyme (anthranilate, cynurénine, tryptamine...), ne sont pas inducteurs. A partir de cette observation, nous avons même pu vérifier que l'addition d'un inhibiteur de l'activité de la

Tryptophanase (cynurénine ou anthranilate) à une culture lors de l'induction par le tryptophane conduit à une diminution importante du taux d'induction de cette protéine.

On peut donc en conclure que l'un des produits du catabolisme du tryptophane par la Tryptophanase est nécessaire à l'induction de la Tryptophanase. Cette conclusion est à rapprocher de la découverte de produits de transgalactosylation par la Galactosidase comme véritables inducteurs de l'opéron lactose (Burstein, 25).

L'isolement de ce métabolite permettrait peut-être la caractérisation de l'inducteur vrai de la Tryptophanase, et ouvrirait ainsi la voie à la compréhension du véritable rôle physiologique de cet enzyme.

BIBLIOGRAPHIE

1. SCOTT, T.A., HAPPOLD, F.C. (1962) *Biochem. J.*, 82, 407.
2. FREUNDLICH, M., LICHSTEIN, H.C. (1960) *J. Bacteriol.*, 80, 633.
3. BEGGS, H.W., LICHSTEIN, H.C. (1965) *J. Bacteriol.*, 89, 996.
4. PASTAN, I., PERLMAN, R.L. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 2226.
5. BOTSFORD, J.L., DE MOSS, R. (1971) *J. Bacteriol.*, 105, 303.
6. MORINO, Y. and SNELL, E.E. (1965) *J. Biol. Chem.*, 240, 1211.
7. GARTNER, T.K., RILEY, M. (1965) *J. Bacteriol.*, 89, 319.
8. HENRY, N.G., GARTNER, T.K. (1963) *J. Bacteriol.*, 85, 245.
9. NEWTON, W.A., SNELL, E.E. (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48, 1431.
10. KAGAMIYANA, H., WADA, H., MATSUBARA, N., SNELL, E.E. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 1571.
11. MONOD, J., COHEN-BAZIRE, G., COHN, M. (1951) *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 153.
12. PARDEE, A.B., PRESTIGE, L.S. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 49, 77.
13. HARTNELL, L.H., MAGASANIK, B. (1964) *J. Mol. Biol.*, 10, 105.
14. BILEZINIAN, J.P., KAEMFER, R.O.R., MAGASANIK, B. (1967) *J. Mol. Biol.*, 27, 495.
15. HILL, R.E., ROWELL, F.J., GUPTA, R.N., SPENCER, I.D. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 1869.
16. BROWN, K.D. (1970) *J. Bacteriol.*, 106, 70.

17. BURROUS, S.E., DE MOSS, R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 623.
18. ROSE, J.F., YANOFSKY, C. (1972) *J. Mol. Biol.*, 69, 103.
19. ULLMANN, A., MONOD, J. (1968) *F.E.B.S. Letters*, 2, 57.
20. PRIVAL, M.J., BRENCULEY, J.E., MAGASANIK, B. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 12.
21. FRITSCH, A., WORCEL, A. (1971) *J. Mol. Biol.*, 59, 207.
22. TAYLOR, A.L., DUNHAM-TROTTER, C. (1972) *Bacteriol. Rev.* 36, 504.
23. BIRD, R.E., LOUARN, J., MARTUSCELLI, J., CARO, L. (1972) *J. Mol. Biol.*, 70, 549.
24. SCHWARTZ, M., WORCEL, A. (1971) *J. Mol. Biol.*, 61, 329.
25. BURSTEIN, C., COHN, M., KEPES, A., MONOD, J. (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 95, 634.

CONCLUSION GENERALE

A l'origine de ce travail, on se proposait d'étudier sur la Tryptophanase certains mécanismes fondamentaux gouvernant le repliement d'une chaîne polypeptidique en une structure tridimensionnelle stéréospécifique. La nécessité d'obtenir de la Tryptophanase pure nous a conduit à mettre au point une méthode de purification de l'enzyme à partir d'extrait brut à haute activité spécifique de Tryptophanase.

Nous avons trouvé des conditions de croissance de la souche sauvage 3000 d'*E. coli* K12 telles que 10 % des protéines synthétisées sont de la Tryptophanase.

L'étude systématique des paramètres influençant la biosynthèse de cet enzyme a montré que son induction exige la synthèse, par les bactéries, d'un métabolite diffusible, labile, produit du catabolisme du tryptophane par la Tryptophanase. Ce composé est soit le véritable inducteur, soit le coinducteur avec le tryptophane de la biosynthèse de la Tryptophanase.

La mise en évidence de ce composé ouvre de nouvelles perspectives pour l'élucidation du rôle physiologique de la Tryptophanase.

La purification de l'enzyme, dont l'étape originale est une centrifugation zonale en gradient de sucrose a permis d'obtenir un enzyme dont les caractéristiques hydrodynamiques ont pu être déterminées. Nous avons ainsi pu montrer que l'enzyme est un tétramère de poids moléculaire 220 000 D, composé de 4 chaînes polypeptidiques identiques portant chacune une molécule de Pyridoxal-phosphate.

Cette dernière caractéristique, en contradiction avec celle trouvée à l'époque sur la Tryptophanase d'*E. coli* B, a depuis lors été confirmée également pour cet organisme bactérien.

Disposant d'enzyme pur, il nous était alors possible d'aborder les problèmes concernant l'acquisition *in vitro* de la structure tridimensionnelle de cet oligomère sans fonction physiologique de régulation.

Les études généralement faites concernant le folding des protéines sont de deux types fondamentalement différents. Elles consistent :

— soit à examiner le résultat final du repliement des chaînes polypeptidiques, c'est-à-dire la structure tridimensionnelle de la protéine par la technique des rayons X,

— soit à essayer de prédire par des calculs de thermodynamique la conformation d'énergie libre minimum, en faisant, explicitement ou implicitement l'hypothèse que cet état fondamental correspond à l'état natif de la protéine.

Les nombreuses études effectuées depuis quelques années par diffraction des rayons X (Perutz, 1967 et 1972 ; Stout, 1968) ont l'avantage de donner des renseignements extrêmement précis sur la nature des zones d'interaction entre acides aminés assurant d'une part la stabilité du repliement de la chaîne polypeptidique d'un monomère et d'autre part l'association de plusieurs sous-unités au sein d'un oligomère. A cet égard, les résultats obtenus sur l'Hémoglobine sont exemplaires.

Cependant ces études présentent l'inconvénient majeur de visualiser une protéine dans un état d'énergie libre minimum certes, mais figé en regard des nombreux mouvements moléculaires dont un enzyme est le siège. De plus, les renseignements donnés par la diffraction des rayons X, concernent le stade final du folding de la protéine et ne peuvent rendre compte des mécanismes structuraux transitoires impliqués dans le repliement d'une macromolécule biologique vers l'état natif.

Quant aux calculs de thermodynamique, ils essayent de déterminer à partir de la séquence des acides aminés d'une protéine sa conformation d'énergie libre minimum et n'ont jusqu'à présent donné que des résultats très partiels (Sheraga, 1968 ; Lee, 1974).

Néanmoins, quels que soient les raffinements que les programmes mathématiques permettront pour calculer ces

structures, les résultats obtenus ne pourront pas répondre aux deux questions suivantes :

— la structure d'énergie libre minimum ainsi calculée est-elle la structure native ?

— quels sont les mécanismes impliqués dans l'acquisition, par la protéine, de sa structure native ?

Ces deux questions correspondent en fait à deux formulations différentes d'un même problème ; car si l'état natif est identique à l'état fondamental, seule l'énergétique des interactions au sein du système protéine-solvant dirigera la recherche de la conformation native. Cette hypothèse, généralement acceptée jusqu'à ces dernières années, commence pourtant à être sérieusement battue en brèche.

Des arguments cinétiques ont conduit Levinthal (1968), puis Wetlaufer (1973) à postuler l'existence de chemins cinétiquement privilégiés pour le folding d'un monomère, afin de limiter considérablement le nombre de structures thermodynamiques possibles. Cette hypothèse devait pouvoir être vérifiée par l'existence et la caractérisation, sur une chaîne polypeptidique donnée de centre de nucléation permettant de guider son repliement spatial.

Diverses expériences de cinétique rapide sur la dénaturation réversible de la ribonucléase et du chymotrypsinogène (Anfinsen, 1972 ; Tsong, 1972) et sur la renaturation du lysozyme (Wetlaufer, 1973 b) apportaient des preuves très indirectes de l'existence de centres de nucléation.

Les études de dénaturation réversible que nous avons effectuées sur la Tryptophanase ont montré que lors du repliement de l'enzyme des interactions quaternaires incorrectes spécifiques entre monomères de Tryptophanase peuvent être mise en évidence. L'existence d'un processus séquentiel impliquant un ou plusieurs centres de nucléation dans le folding de la Tryptophanase est le seul modèle compatible avec cette observation.

Bien que relativement indirects, nos résultats sont, à notre connaissance du moins, la première preuve expérimentale solide à l'appui de l'hypothèse de l'existence de centres de nucléation lors du repliement de relativement petites chaînes polypeptidiques. En effet, si la formation

d'interactions intermonomériques illégitimes a déjà été rapportée (formation de dimères de ribonucléase ou de dimères de la chaîne α de la Tryptophane synthétase), c'est la première fois que leur spécificité a été démontrée et que son importance s'est manifestée lors d'expériences réalisées à des concentrations de protéines « normales ».

Il aurait bien entendu été souhaitable d'entreprendre la caractérisation de ces centres de nucléation. Mais, dans les rares cas où elle a été tentée, celle-ci s'est avérée très difficile à réaliser ; et il est vraisemblable que cela tienne au fait que la durée de vie de ces centres de nucléation à l'état structuré est trop courte pour les méthodes de détection utilisées. Une alternative autre que la technologie existe peut-être. On peut effectivement se demander si un centre de nucléation, même à très courte durée de vie ne pourrait pas conduire, au sein de la chaîne polypeptidique, à des structures globulaires partielles mais suffisamment stables pour être observées.

L'existence de tels globules à repliement indépendant du reste de la protéine et indispensables au folding d'une protéine serait une preuve *a fortiori* et *a posteriori* de l'existence de centres de nucléation. De tels globules ont pu être mis en évidence pour la β -Galactosidase (fragment Ω ; Goldberg, 1968) et pour l'Aspartokinase (Véron, Thèse de Doctorat, Paris, 1974) et ils sont en cours d'exploration dans notre laboratoire.

L'implication de centres de nucléation et de globules dans le folding d'une protéine a pu être démontrée dans ces quelques cas. Des mécanismes plus fins peuvent aussi être imaginés. On peut envisager par exemple que les interactions quaternaires puissent intervenir dans l'étape finale du repliement d'une macromolécule oligomérique.

En particulier, lors de la formation d'un oligomère, les contraintes exercées par les aires d'association entre protomères peuvent peut-être modifier la conformation et, par conséquent la spécificité des protomères. C'est à ce dernier aspect que le travail sur les hybrides de Tryptophanase a été consacré.

L'obtention et la caractérisation de molécules hybrides

nous a permis de mettre en évidence le rôle des interactions quaternaires de modifier une des propriétés hydrodynamiques des protomères. Nous avons pu interpréter ce rôle en termes de couplage énergétique entre structures quaternaire et tertiaire de la Tryptophanase. Si, comme nous avons toutes raisons de le penser, ce couplage énergétique s'accompagne d'un couplage structural, nous aurions là un exemple du rôle de la structure quaternaire d'un oligomère dans la modulation du repliement initial des protomères et de son expression dans leur spécificité fonctionnelle.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

1. ANFINSEN, C.B. (1972) *Biochem. J.*, 128, 737.
2. BERTLAND, L.H., KAPLAN, N.O. (1968) *Biochemistry*, 7, 134.
3. COLOMBO, B. BAGLIONI, C. (1966) *J. Mol. Biol.*, 16, 51.
4. EYRING, H., POLANYI, M. (1931) *Z. Physik. Chem.*, B12, 279.
5. GOLDBERG, M.E. (1969) *J. Mol. Biol.*, 46, 441.
6. GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S., DADIV, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.*, 177, 751.
7. KAGANIYAMA, H., WADA, H., MATSUBARA, H., SNELL, E.E. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 1571.
8. HABER, J.E., KOSHLAND, D.E. Jr. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 58, 2087.
9. HATAWAY, A.M., KIDA, S., CRAWFORD, I.P. (1969) *Biochemistry*, 8, 991.
10. HOAGLAND, V.D., Jr., TOLLER, D.C. (1969) *Biochemistry*, 8, 594.
11. KOSHLAND, D.E. Jr., NEMETHY, G., FILMER, D. (1968) *Biochemistry*, 5, 365.
12. LEE, Y.N., HAMORI, E. (1974) *Biopolymers*, 13, 77.
13. LEVINTHAL, C.J. (1968) *J. Chim. Phys.*, 65, 44.
14. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N., FARR, A.L., RANDALL, R. (1951) *J. Biol. Chem.*, 133, 265.
15. MATTEHWS, B.W., BERNHARD, S.A. (1973) in: *Ann. Rev. of Biophys. Bioengn.*, vol. 2, pp. 257.
16. MEIGHEN, E.A., SCHACHMAN, H.K. (1969) *Fed. Proc.*, 28, 532.
17. MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEUX, J.P. (1965) *J. Mol. Biol.*, 12, 88.
18. MORINO, Y., SNELL, E.E. (a) (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 5591.
19. MORINO, Y., SNELL, E.E. (b) (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 5602.
20. MUIRHEAD, H. COX, J.M., MAZZARELLA, L., PERUTZ, M.F. (1967) *J. Mol. Biol.*, 28, 117.
21. NEWTON, W.A., MORINO, Y., SNELL, E.E. (1968) *J. Biol. Chem.*, 240, 1211.
22. NEWTON, W.A., SNELL, E.E. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 51, 382.
23. O'LEARY, H.M., MALIK, J.M. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7097.

24. PERUTZ, M.F. (1972) *Nature*, 237, 495.
25. POHL, F.M. (1968) *Eur. J. Biochem.*, 4, 373.
26. RAIBAUD, O., GOLDBERG, M.E. (1973) 248, 3451.
27. SCOTT, R.A., SHERAGA, H.A. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 55, 3866.
28. SHAPIRO, A.L., SCHARFF, M.D., MAIZEL, J.V. Jr., UHR, J.W. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56, 216.
29. SHERAGA, H.A. (1968) *Adv. in Phys. Org. Chem. Acad. N.Y.*, p. 103.
30. STOUT, G.H., JENSEN, L.H. (1968) "X Ray Structure Determination" A Practical Guide, MacMillan Publis, New York 1968.
31. TSONG, T.Y., BALDWIN, R.L., McPHIE, P. (1972) *J. Mol. Biol.* 63, 453.
32. VERON, M. (1974) *Thèse de Doctorat - Paris*.
33. WETLAUFER, D.B. (a) (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 70, 697.
34. WETLAUFER, D.B., RISTOW, S. (b) (1973) in: *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 134.

ACHEVÉ D'IMPRIMER LE
30 DÉCEMBRE 1974 PAR
L'IMPRIMERIE CENTRALE
COMMERCIALE (J. LONDON,
IMPRIMEUR), A PARIS.

